

**Del I: Bioaktive forbindelser i *Ximenia
americana* blad**

Del II: Etnofarmakologiske studier i Mali

Nhat Hao Tran Le



Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2011

Del I: Bioaktive forbindelser i *Ximenia americana* blad

Del II: Etnofarmakologiske studier i Mali

Av Nhat Hao Tran Le

Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Oslo, mai 2011

Veiledere:

Førsteamanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Drissa Diallo

Forord

Først vil jeg rette en stor takk til Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud for god oppfølging og høy faglig kompetanse. Gjennom god veiledning har dere bidratt til å gjøre dette til et lærerikt hovedfagsår.

Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen og Drissa Diallo for tilrettelegging og gjennomføring av etnofarmakologiske studier i Mali.

Takk til reisefølget mitt i Mali, Selma Meskini og Celine Nguyen, for en fantastisk og minnerik tur.

Ellers vil jeg takke Tuan Nguyen og Toan Thanh Tran for korrekturlesing, Astrid Gjelstad for å være behjelpelig med tekniske problemer og Bente Rasch for bestilling av artikler. Jeg vil også takke alle ansatte ved avdelingen for stor hjelpsomhet og et trivelig hovedfagsår.

Tilslutt vil jeg takke familien og kjæresten min for støtte i alle mine fem år på farmasistudiet.

Oslo, mai 2011

Nhat Hao Tran Le

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag.....	1
2	Forkortelser	2
3	Hensikt	3
4	Bakgrunn	5
4.1	<i>Ximenia americana</i>	5
4.1.1	Taksonomisk klassifisering.....	5
4.1.2	Lokale navn.....	5
4.1.3	Botaniske forhold.....	6
4.1.4	Habitat.....	8
4.1.5	Tradisjonell bruk.....	8
4.1.6	Tidligere funn	9
4.2	Antioksidanter og frie radikaler.....	13
4.2.1	Antioksidanter.....	13
4.2.2	Antioksidantforsvar	13
4.2.3	Frie radikaler og ROS	14
4.2.4	Dannelse av frie radikaler og ROS	14
4.2.5	Oksidativt stress	14
4.2.6	Lipidperoksidering.....	14
4.3	Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase	17
4.4	Flavonoider.....	19
5	Eksperimentelt.....	21
5.1	Materialer	21
5.1.1	Kjemikalier	21
5.1.2	Apparatur	22
5.2	Metoder.....	24
5.2.1	Generelle metoder.....	24
5.2.2	Separasjonsmetoder	24
5.2.3	Identifikasjonsmetoder.....	32
5.2.4	Metoder for måling av biologisk aktivitet.....	41
5.3	Eksperimentell utførelse	49
5.3.1	Utgangsmateriale	49
5.3.2	Ekstraksjon av EtOH-råekstrakt.....	49
5.3.3	Fraksjonering av EtOAc-ekstrakt.....	51
5.3.4	Separasjon av fraksjon E2.....	54

5.3.5	Separasjon av fraksjon E2.1	55
5.3.6	Separasjon av fraksjon E2.3	57
5.3.7	Separasjon av fraksjon E2.4	58
5.3.8	Separasjon av fraksjon E6	59
5.3.9	Separasjon av fraksjon E6.2-3	60
5.3.10	Separasjon av fraksjon S3	61
5.3.11	Separasjon av fraksjon S3.3	62
5.3.12	Separasjon av fraksjon S3.3.2	63
5.3.13	Separasjon av fraksjon S3.3.2.3	64
5.3.14	Separasjon av fraksjon S3.3.2.4	65
5.3.15	Separasjon av fraksjon S3.4	66
5.3.16	Separasjon av fraksjon 3.4.3	67
5.3.17	Separasjon av fraksjon S3.4.3.1	67
5.3.18	Separasjon av fraksjon S3.4.3.1.1	68
5.3.19	Separasjon av fraksjon S3.4.3.1.1.1	68
5.3.20	Separasjon av fraksjon S3.4.9	69
6	Resultater og diskusjon	70
6.1	EtOH-råekstrakt	70
6.1.1	NMR-spektroskopi	70
6.1.2	Bioassay	70
6.2	Ekstraksjon av EtOH-råekstraktet	73
6.2.1	Væske-væske ekstraksjon	73
6.2.2	NMR-spektroskopi	74
6.2.3	Bioassay	75
6.2.4	Analytisk HPLC	77
6.2.5	Videre arbeid	77
6.3	Fraksjonering av EtOAc-ekstrakt	77
6.3.1	Versaflash kolonneseparasjon	77
6.3.2	NMR-spektroskopi	78
6.3.3	Bioassay	80
6.3.4	Analytisk HPLC	81
6.3.5	Videre arbeid	82
6.4	Separasjon av fraksjon E2	82
6.4.1	Versaflash kolonneseparasjon	82
6.4.2	Bioassay	83
6.4.3	NMR-spektroskopi	84
6.4.4	Videre arbeid	85
6.5	Separasjon av fraksjon E2.1	85

6.5.1	Preparativ HPLC.....	85
6.5.2	NMR-spektroskopi.....	86
6.5.3	B-D glukogallin	86
6.5.4	Bioassay	88
6.5.5	Gallesyre	89
6.5.6	Bioassay	90
6.6	Separasjon av fraksjon E2.3	92
6.6.1	Preparativ HPLC.....	92
6.6.2	NMR-spektroskopi.....	92
6.7	Separasjon av fraksjon E2.4	93
6.7.1	Preparativ HPLC.....	93
6.7.2	NMR-spektroskopi.....	93
6.7.3	1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose	93
6.7.4	Bioassay	96
6.8	Separasjon av fraksjon E6	96
6.8.1	Versaflash kolonne-separasjon.....	96
6.8.2	Bioassay	97
6.8.3	NMR-spektroskopi.....	98
6.8.4	Videre arbeid.....	99
6.9	Separasjon av fraksjon E6.2-3	99
6.9.1	Sephadex LH-20 kolonne-separasjon.....	99
6.9.2	NMR-spektroskopi.....	100
6.9.3	Sambunigrin.....	100
6.9.4	Bioassay	102
6.10	Separasjon av fraksjon S3.....	103
6.10.1	Sephadex LH-20 kolonne-separasjon.....	103
6.10.2	NMR-spektroskopi.....	104
6.10.3	Videre arbeid.....	104
6.11	Separasjon av fraksjon S3.3.....	104
6.11.1	Versaflash kolonne-separasjon.....	104
6.11.2	NMR-spektroskopi.....	105
6.11.3	Videre arbeid.....	105
6.12	Separasjon av fraksjon S3.3.2.....	105
6.12.1	Preparativ HPLC.....	105
6.12.2	NMR-spektroskopi.....	106
6.12.3	Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid.....	106
6.12.4	Bioassay	109
6.13	Separasjon av fraksjon S3.3.2.3.....	110

6.13.1	Preparativ HPLC.....	110
6.13.2	NMR-spektroskopi.....	111
6.14	Separasjon av fraksjon S3.3.2.4.....	111
6.14.1	Preparativ HPLC.....	111
6.14.2	NMR-spektroskopi.....	112
6.14.3	Quercetin-3-O-rhamnopyranosid	112
6.14.4	Bioassay	115
6.15	Separasjon av fraksjon S3.4.....	116
6.15.1	Preparativ HPLC.....	116
6.15.2	NMR-spektroskopi.....	117
6.15.3	Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid.....	117
6.15.4	Bioassay	120
6.15.5	Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid	122
6.15.6	Bioassay	124
6.16	Separasjon av fraksjon S3.4.3.....	125
6.16.1	Preparativ HPLC.....	125
6.16.2	NMR-spektroskopi.....	125
6.17	Separasjon av fraksjon S3.4.3.1.....	125
6.17.1	Preparativ HPLC.....	125
6.17.2	NMR-spektroskopi.....	126
6.18	Separasjon av fraksjon 3.4.3.1.1 og underfraksjonene	126
6.18.1	Preparativ HPLC og NMR-spektroskopi	126
6.18.2	Kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid	127
6.18.3	Bioassay	129
6.19	Separasjon av fraksjon S3.4.9.....	130
6.19.1	Preparativ HPLC.....	130
6.19.2	NMR-spektroskopi.....	130
6.19.3	Quercetin.....	131
6.19.4	Bioassay	132
7	Etnofarmakologiske studier i Mali	136
7.1	Etnofarmakologi	136
7.2	Mali	136
7.3	Helse og tradisjonell medisin i Mali	138
7.4	Feltarbeid.....	140
7.4.1	Intervju i Bamako	140
7.4.2	Intervju i Siby	142
7.4.3	Intervju i Dioïla.....	146
7.4.4	Intervju i Banatou	158

7.4.5	Intervju i Fiana.....	159
7.5	Forklaring av ord og uttrykk.....	161
7.6	Oppsummering	162
8	Konklusjon	165
8.1	Forslag til videre arbeid.....	166
9	Vedlegg	167
9.1	Flytskjema	167
9.1.1	Flytskjema 1.....	167
9.1.2	Flytskjema 2.....	168
9.1.3	Flytskjema 3.....	169
9.1.4	Flytskjema 4.....	170
9.1.5	Flytskjema 5.....	171
9.1.6	Flytskjema 6.....	172
9.1.7	Flytskjema 7.....	173
9.1.8	Flytskjema 8.....	174
9.1.9	Flytskjema 9.....	174
9.1.10	Flytskjema 10.....	175
9.1.11	Flytskjema 11.....	176
9.1.12	Flytskjema 12.....	177
9.2	NMR-spektra	177
10	Kildeliste	194

1 Sammenheng

Etanolrækstraktet av *Ximenia americana* blad ble ekstrahert med løsemidlene etylacetat, butanol og vann. Etylacetatekstraktet utgjorde den største fraksjonen. Isolering og opprensing av ekstrakter og fraksjoner ble utført ved væske-væske kromatografi, kolonnekromatografi og tynnsjikt-kromatografi. De isolerte forbindelsene ble strukturopklart ved hjelp av ^1H -, ^{13}C -, APT-, COSY, HMQC og HSQC NMR-spektroskopi.

Sambunigrin og gallesyre ble isolert fra etylacetatekstraktet. I tillegg ble gallotanninene β -D-glukogallin og 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose isolert og identifisert. Det ble funnet seks flavonoider i etylacetatekstraktet. Disse var quercetin, quercetin-3-O-rhamnopyranosid, quercetin-3-O- α -arabinofuranosid, quercetin 3-O- β -D-xylopyranosid, quercetin 3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid og kaempferol 3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Det var kun sambunigrin av de isolerte stoffene som var identifisert i planten tidligere.

Rækstraktet, ekstrakter, mellomfraksjoner og isolerte forbindelser ble testet for radikalscavenging aktivitet ovenfor radikalet DPPH. Det ble også utført hemming av 15-lipoksygenase (15-LOX) fra soyabønner og hemming av xantin oksidase (XO) fra kumelk.

Etylacetatekstraktet hadde god radikalscavenger aktivitet. Ekstraktet viste også hemming av 15-LOX og XO. Butanolekstraktet hadde en svakere aktivitet enn etylacetatekstraktet, mens vannekstraktet var inaktivt. Av de isolerte forbindelsene var det quercetin og gallesyre som hadde høyest radikalscavenger aktivitet. Quercetin var også mest potent ved hemming av 15-LOX og XO. Struktur-aktivitetsforhold har mye å si for antioksidant-og antiradikaleffekten til forbindelsene.

I den etnofarmakologiske studien ble 38 healere intervjuet om den tradisjonelle bruken av *X.americana*. Det var 48 indikasjoner som ble oppgitt for planten og de hyppigste var mot halsbetennelse, amenoré og som tonic for barn. Blad, rotbark og rot var de mest anvendte plantedelene og plantematerialet ble vanligvis tilberedt i form av et dekokt eller pulver.

2 Forkortelser

Tabell 2.1: Oversikt over forkortelser i oppgaven

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
ACN	Acetonitril
APT	Attached proton test
BuOH	Butanol
C	Karbon
CD ₃ OD	Deuterert metanol
COSY	Correlation spectroscopy
COX	Cyklooksygenase
D ₂ O	Tungtvann
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMT	Department of traditional medicine
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EtOAc	Etylacetat
EtOH	Etanol
FI	Farmasøytisk institutt
H	Hydrogen
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IC ₅₀ eller RC ₅₀	Konsentrasjon som gir 50% radikalscavenging eller hemming
l	Liter
LOX	Lipoksygenase
MeOH	Metanol
NMR	Nukleær magnetisk resonans
RP	Reverse phase
TFA	Trifluorediksyre
TLC	Tynnsjiktskromatografi
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett
<i>X.americana</i>	<i>Ximenia americana</i>
XO	Xantin oksidase

3 Hensikt

I lang tid har mennesker benyttet seg av planter for å lindre eller lege sykdommer og smerter. Selv om man ikke visste hvilke stoffer i plantene som ga de positive effektene, har den tradisjonelle bruken blitt overført fra generasjon til generasjon. I dag benytter de fleste land seg av industrielt framstilte legemidler, men det finnes land som fremdeles benytter seg av plantemedisin. Dette kan skyldes at bruk av plantemedisin er fortsatt en del av kulturen eller fordi industrielt framstilte legemidler er for dyre.

Ximenia americana er en plante fra Mali og blir brukt av tradisjonelle healere i behandlingen av ulike sykdommer og lidelser. Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere biologisk aktive lavmolekylære substanser i planten. Det er interessant å finne ut hvilke substanser som finnes i planten for å kunne sette det i sammenheng med den tradisjonelle bruken. Biologiske tester (enzymhemming- og antiradikaleffekter) ble utført på rækstrakter, utvalgte delfraksjoner og isolerte rensustanser. I tillegg ble etnofarmakologiske studier gjennomført i Mali for å fremskaffe informasjon om planten.

Del I

Bioaktive forbindelser i *Ximenia americana*
blad

4 Bakgrunn

4.1 *Ximenia americana*

4.1.1 Taksonomisk klassifisering

Systematikk for *Ximenia americana* er som følgende (USDA 2011):

Rike:	Plantae
Subrike:	Tracheobionta
Superdivisjon:	Spermatophyta
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Magnoliopsida
Subklasse:	Rosidae
Orden:	Santalales
Familie:	Olacaceae
Slekt:	<i>Ximenia</i> L.
Art:	<i>Ximenia americana</i> L.

Synonym: *Ximenia inermis* L. (ITIS 2011).

4.1.2 Lokale navn

Etiopia: Enkoy (Geyid et al. 2005)

Fulani (Nigeria): Chabbuli (Maikai et al. 2008)

Guinea: Gbani (Magassouba et al. 2007)

Hausa (Nigeria): Tsada (Maikai et al. 2008)

Mali: Hongbé, sené, séno, ntonké (Burkill 1997; Grønhaug et al. 2008)

4.1.3 Botaniske forhold

Ximenia americana (*X.americana*) er et variert buskaktig tre som kan bli 5 m høyt. Veden er gul eller gulrød, hard, tung, finfibret og minner om buksbomved. Den har en duft som sandeltre. Trestammen og grenene overstiger sjeldent 10 cm i diameter. Barken er sprukket og noe ruglete. Avhengig av voksestedet, kan treet eksistere med eller uten torner (Burkill 1997). Tornene ligger ved bladroten, de er rette, veldig spisse, brune og er 1-1.5 cm lange. Planten har smale ellipseformede blader eller eggformede blader med en smal ende ved roten. Bladene er vekselstilte, glatte og noe læraktige (Arbonnier 2004). De er i tillegg papirtynne eller semi-sukkulente (Burkill 1997), 3-9 cm lange og 1.5-4 cm på tvers, avrundet eller kileformet. Ved roten er de kileformet og litt glatt under (Arbonnier 2004). Duften av bladene kan minne om bitter mandel. Frukten er over 2.5 cm lang og blir gul ved modning. Den har en plommeliknende form, avlang og glatt (Burkill 1997). Frukten inneholder en hard stein omgitt av fruktkjøtt. Blomsten er kremhvitt til grønn gul, 0.8 cm i diameter, med fire triangulære begerblad og fire kronblad. Den er tett hårete på innsiden. Planten blomstrer vanligvis i den andre delen av tørkesesongen (Arbonnier 2004).



Figur 4.1: *X.americana* tre i Siby, Mali, februar 2011



Figur 4.2: X.americana blad i Dioila, Mali, februar 2011



Figur 4.3: X.americana blad med Loranthus-parasitt i Dioila, Mali, februar 2011

4.1.4 Habitat

X. americana er en planteart som vokser nær ekvator (pantropical species) og forekommer i Afrika fra Senegal til Kamerun (Arbonnier 2004). Planten forekommer også i tropisk Amerika og Asia (Burkill 1997).

4.1.5 Tradisjonell bruk

X. americana er en plante med medisinske egenskaper. Forskjellige deler av planten blir tatt i bruk ved behandling av ulike lidelser/sykdommer. I Mali blir røtter og blader mest brukt, og de vanligste tilberedningsmetodene er som dekokt eller pulver. Dekokt blir brukt til bad og/eller til å drikkes. Pulver blir vanligvis løst i badevann og/eller til å drikkes. Pulver kan også bli brukt til inhalasjon ved å kaste pulveret i en flamme. Hovedbruksområder for planten i Mali er halsbetennelse, malaria og dysmenoré (Grønhaug et al. 2008).

I nordlige deler av Nigeria blir *X. americana* brukt i tradisjonell medisin ved behandling av malaria, spedalskhet og hudinfeksjoner (Ogunleye og Ibitoye 2003). Røttene blir brukt ved feber, diaré, gulsott, stomatitt og tannverk. Pulverisert bark anses som et godt rensemiddel. I Casamance bløtlegges infiserte føtter i kokende vann med knust bark og salt, deretter bindes de i tøy over natten slik at død hud faller av. Rotbark blir brukt i febernedsettende medisiner mot schistosomiasis, og røttene mot innvollsormer, spedalskhet og impotens. Bladene er adstringerende, og en infusjon av disse blir brukt i Zaire (dagens Kongo) som et gurglevann. Dekokt av bladkvist blir anvendt i de nordlige delene av Nigeria mot forkjølelse og hoste, forstoppelse, som øyelotion og som munnvann mot tannsmarter. Friske blader, og røtter, blir benyttet topikalt ved feberrelatert hodepine, spesielt for barn. I Senegal blir blader brukt som plaster over sår, og i Gabon blir de benyttet ved slangebitt eller andre typer giftige bitt. Fruktkjøttet har også medisinske egenskaper. I Lagos (Nigeria) blir fruktkjøttet benyttet ved blod i avføring og ved kronisk forstoppelse der kraftig avføringsmiddel er kontraindisert. I Etiopia fungerer frukten som markdrivende ved høyt inntak (Burkill 1997).

Utenom medisinske egenskaper anses *X. americana* å ha medisinsk-magiske egenskaper. Bladene, og spesielt røttene, blir brukt for å jage vekk onde ånder. Bark og røtter benyttes også for å utvinne fargestoffer til bruk på blant annet lær (Burkill 1997; Arbonnier 2004). Frukten kan spises rå, men noen deler av frukten inneholder giftige stoffer. Hydrogencyanid er et giftig stoff som er angitt å finnes i frø og man bør derfor unngå å tygge på frøene (Agroforestry 2011).

4.1.6 Tidligere funn

Det er blitt gjort en del forskning på *X.americana*. Et søk i databasen, SciFinder, med søkeordet *Ximenia americana* ga 83 treff (24. mars 2011). I følge litteraturen inneholder planten biologisk aktive komponenter som for eksempel flavonoider, men det er ikke presisert hvilke typer flavonoider det er. Dette tyder på at det kreves mer forskning. Mye av det som er publisert hittil omhandler lipidinnholdet i planten (se tabell 4.1).

Tabell 4.1: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *X.americana*

Kjemisk stoffgruppe	Komponent	Plantedel	Kilde
Aromater	Benzaldehyd	Blad	(Mevy et al. 2006)
Flavonoider	Ikke oppgitt	Blad	(Ogunleye og Ibitoye 2003)
	Ikke oppgitt	Frukt	(Lamien-Meda et al. 2008)
Cyanogene forbindelser	Hydrogencyanid	Pulpa	(Agroforestry 2011)
	Hydroksybenzyl cyanid	Blad	(Mevy et al. 2006)
	Sambunigrin	Plante	(Finnermore og Cooper 1938)
Fenoler	Ikke oppgitt	Frukt	(Lamien-Meda et al. 2008)
Lipider	Arakidonsyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Cerotinsyre	Kjerne	(Burkill 1997)
	Dimetyl-5-metyl-28,29-dihydroksy-dotriacont-3,14,26- triendioat	Frø	(Saeed og Bashier 2010)
	Eikosatriensyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Erukasyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Linolensyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Linolsyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Metyl-14,14-dimetyl-18-hydroksy heptatriacont-27,35-dienoat	Frø	(Saeed og Bashier 2010)
	Nervonsyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Oljesyre	Frø	(Eromosele og Eromosele 2002)
	Ximensyre	Kjerne	(Burkill 1997)
	Ximenynsyre	Frø, rot	(Hatt et al. 1960)
Resiner	Ikke oppgitt	Blad	(Burkill 1997)
Saponiner	Ikke oppgitt	Blad	(Ogunleye og Ibitoye 2003)
Steroider	3-O-(β -D-glucopyranosyl) sitosterol	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	Stigmastane	Plante	(de Araújo et al. 2008)
	Stigmasterol	Stengel	(de Araújo et al. 2009)
Tanniner	Ikke oppgitt	Blad	(Ogunleye og Ibitoye 2003)

Terpener	3-oxo-oleanolsyre	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	3 β -hydroksycycloart-24-(E)-ene-26-oic acid	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	28-O-(β -glucopyranosyl)- oleanolsyre	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	Betulinsyre	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	Isophorone	Blad	(Mevy et al. 2006)
	Oleanolsyre	Stengel	(de Araújo et al. 2008)
	Ximonican	Plante	(de Araújo et al. 2009)

4.1.6.1 Biologisk aktivitet

Akutt toksisitet

Ekstrakt av *X.americana* stammebark ble administrert intraperitonealt eller oralt i "swiss albino" rotter. Det ble observert oppstemthet, urolighet og mangel på appetitt hos rottene (doseavhengig), men ingen dødsfall ved doser opp til 5000 mg/kg kroppsvekt (Maikai et al. 2008).

Analgetisk aktivitet

Metanolekstrakt av *X.americana* blad ble undersøkt for analgetisk effekt i "swiss albino" mus. Metanolekstraktet ble administrert intraperitonealt ved doser på 200 mg/kg, 400 mg/kg og 600 mg/kg. Tester som "Hot plate" og "tail flick" ble benyttet. Resultatene viste at metanolekstraktet hadde en doseavhengig antinociseptiv aktivitet som ble observert ved signifikant økning i reaksjonstid i testene sammenlignet med kontrollgruppen. Men metanolekstraktet hadde lavere aktivitet enn morfinsulfat som ble brukt som positiv kontroll i analysen (Hemamalini et al. 2011).

Antimalaria aktivitet

Ekstrakt av *X.americana* viste sterk antimalaria aktivitet sammenliknet med *Azadirachta indica* (en plante med kjent antimalaria aktivitet). Hemming av vekst *in vitro* ble observert i en klorokinsensitiv stamme og en klorokinresistent stamme av *Plasmodium falciparum* (Benoit et al. 1996).

Antimikrobiell aktivitet

Det er vist at etanolekstrakt av *X.americana* blad har antimikrobiell aktivitet mot seks testorganismer: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* og *Candida albicans*. Artikkelen som har kommet med

denne konklusjonen inneholder uklarheter. Allikevel har mange forfattere benyttet denne artikkelen som referanse i sine artikler (Ogunleye og Ibitoye 2003).

Ekstrakter av *X.americana* bark, blad, rot og stamme ble testet for antimikrobiell og antifungal aktivitet. Løsningsmidler som ble brukt var kloroform, metanol og vann. Resultatene viste at metanolekstraktet var mest aktivt blant ekstraktene. *Staphylococcus aureus* var mest følsom blant bakteriene, mens *Saccharomyces cerevisiae* var mest følsom blant sopp (Omer og Elnima 2003).

Etanolekstrakt av *X.americana* rot viste antibakteriell aktivitet *in vitro* på bakteriestammene *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* og *Bacillus subtilis* (Koné et al. 2004).

Antineoplastisk aktivitet

Et nytt type II ribosom-inaktiverende protein, riproximin, er blitt identifisert i *X.americana*. Det er riproximin som gir den antineoplastiske aktiviteten (Voss et al. 2006).

Antioksidant aktivitet

X.americana stammebark viste god antioksidant aktivitet på DPPH-scavenging.

Metanolekstrakt av stammebarken ble delt i mindre porsjoner og disse viste ulike grader av aktivitet: flavonoidporsjonen viste høyest aktivitet (RC50= 8.20 ± 1.10 µg/ml). Askorbinsyre ble brukt som standard (RC50= 10.60 ± 2.20 µg/ml) (Maikai et al. 2010).

Antipyretisk aktivitet

Vandig ekstrakt av stammebarken fra *X.americana* viste antipyretisk aktivitet i rotter (Soro et al. 2009).

Antiviral aktivitet

Hydroalkoholisk ekstrakt av *X.americana* stammebark viste antiviral aktivitet. Aktiviteten ble oppnådd ved konsentrasjoner som var lavere enn det som er nødvendig for å produsere cytotoxicitet (Asres et al. 2001).

Antitrypanosomal aktivitet

Trypanosomiasis er en gruppe sykdommer som påvirker både mennesker og dyr. Sykdommene skyldes parasittiske trypanosomer. Flavonoidfraksjon av *X.americana* ved en konsentrasjon på 10 mg/ml er vist å signifikant lamme eller drepe parasittene i infisert blod *in vitro*, sammenlignet med kontrollen som var infisert blod inkubert med dimetylsulfoksid (DMSO). Det ble også testet *in vivo* hvor infisert blod ble inokulert i ”swiss albino” mus. Resultatene viste at en dose på 25 mg/ml er mer effektiv i undertrykkingen av formering eller vekst av parasittene sammenliknet med ubehandlet gruppe av mus. Aktiviteten av flavonoidfraksjonen av *X.americana* var doseavhengig (Maikai 2011).

Hemming av nevromuskulær aktivitet

Metanolekstrakt av *X.americana* blad, stammebark og rot i en dose fra 100-1000 mg/kg kroppsvekt viste signifikant reduksjon av motorisk aktivitet i Wistar rotter. Ekstraktet påvirket alle normale bevegelsesmønstre karakterisert av mangel på koordinasjon på grunn av feil i hastighet, grad, styrke og retning av bevegelse. Dette tydet på at lillehjernen (cerebellar hemisphere) ble påvirket av ekstraktet. Lillehjernen er kjent for å interagere med ”motor cortex” i planlegging og styring av bevegelser. Hemming av nevromuskulær oppførsel kan skyldes blant annet innholdet av tanniner, saponiner, alkaloider og flavonoider i planten. Tanniner og flavonoider er kjent for å indusere spasmolytisk aktivitet, og begge stoffene hemmer kalsiumkanaler som fører til muskelrelaksasjon. I tillegg har det blitt rapportert at saponiner og alkaloider har potent sedativ aktivitet og angstdempende virkning (Abubakar og Salka 2010).

Hemming av nitrogenoksid (NO)-produksjon

Overproduksjon av NO i kroppen kan føre til patofysiologiske prosesser. Vandig ekstrakt av *X.americana* viste hemming av NO-produksjonen i lipopolysakkarid (LPS)-aktivert RAW 264.7 makrofager (Kumar-Roiné et al. 2009).

Sårhelende aktivitet

Vannekstrakt av *X.americana* rotbark og *X.americana* stammebark viste sterk effekt på komplementsystemet. Karbohydrater som finnes i *X.americana* er hovedsakelig sammensatt av arabinose og galaktose. Arabinogalaktaner er tidligere vist å ha antikomplementær aktivitet (Diallo et al. 2002).

4.2 Antioksidanter og frie radikaler

4.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som, når den foreligger i lavere konsentrasjon enn et oksiderbart substrat, signifikant forsinker eller forhindrer oksidasjon av det oksiderbare substratet (Halliwell 2005). Oksiderbare substrater inkluderer nesten alle molekyler som finnes *in vivo*. Eksempler på disse er lipider, proteiner, karbohydrater og DNA (Halliwell 1991).

4.2.2 Antioksidantforsvar

Kroppen har utviklet et antioksidantforsvar mot oksidative skader. Forsvaret består av naturlige antioksidanter i kroppen (inkludert enzymer) og antioksidanter fra kosten. Antioksidanter kan redusere dannelsen av frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS), reagere med og uskadeliggjøre dem, hemme peroksideringsprosesser og reparere oksidative skader (Halliwell og Gutteridge 2007).

Naturlige antioksidanter i kroppen:

- Superoksid dismutaser, fjerner effektivt $O_2^{\cdot -}$
- Katalaser, omdanner hydrogenperoksid (H_2O_2) til oksygen og vann
- Gluthation peroksidaser, fjerner H_2O_2
- Glutathion, scavenger frie radikaler og ROS
- α -lipoinsyre, scavenger frie radikaler og ROS

Det er mange antioksidanter fra kosten. For eksempel:

- Vitamin C, scavenger frie radikaler og ROS
- Vitamin E, scavenger lipidperoksyd radikaler
- Flavonoider, scavenger frie radikaler og ROS
- Karotenoider, deaktiverer singlet oksygen

4.2.3 Frie radikaler og ROS

I atomer og molekyler assosierer elektroner vanligvis i par. Hvert par beveger seg innen et definert område (en atomisk eller molekylær orbital). Et fritt radikal er enhver specie som er i stand til å eksistere uavhengig, og som inneholder ett eller flere uparede elektroner.

ROS er et samlebegrep og inkluderer både oksygenradikaler og ikke-radikale derivater av oksygen. Eksempler på disse er superoksid (O_2^-), hydroksyl (OH \cdot) og hydrogenperoksid (H_2O_2) (Halliwell 2005). Alle oksygenradikaler er ROS, men ikke alle ROS er oksygenradikaler (Halliwell og Gutteridge 2007).

4.2.4 Dannelse av frie radikaler og ROS

Frie radikaler og andre ROS blir kontinuerlig dannet i kroppen som et resultat av en normal oksidativ metabolisme. Ved skader på mitokondriene kan det føre til økt dannelse av ROS. Noen radikaler og ROS kan også bli syntetisert av ulike typer celler i kroppen. Selv om frie radikaler og ROS kan føre til patologiske prosesser, kan de også ha nyttige funksjoner ved å delta i kroppens forsvar mot skadelige bakterier.

Eksogene faktorer kan også gi opphav til frie radikaler. Eksempler på eksogene faktorer er ioniserende stråling (Halliwell 1991), luftforurensning og røyking.

4.2.5 Oksidativt stress

Oksidativt stress refererer til alvorlig ubalanse mellom produksjon av reaktive species og antioksidantforsvar. Det kan skyldes lave nivåer av antioksidanter eller overproduksjon av reaktive species. Oksidativt stress kan skade biologiske molekyler og er involvert i mange sykdommer som diabetes og kreft (Halliwell 2005).

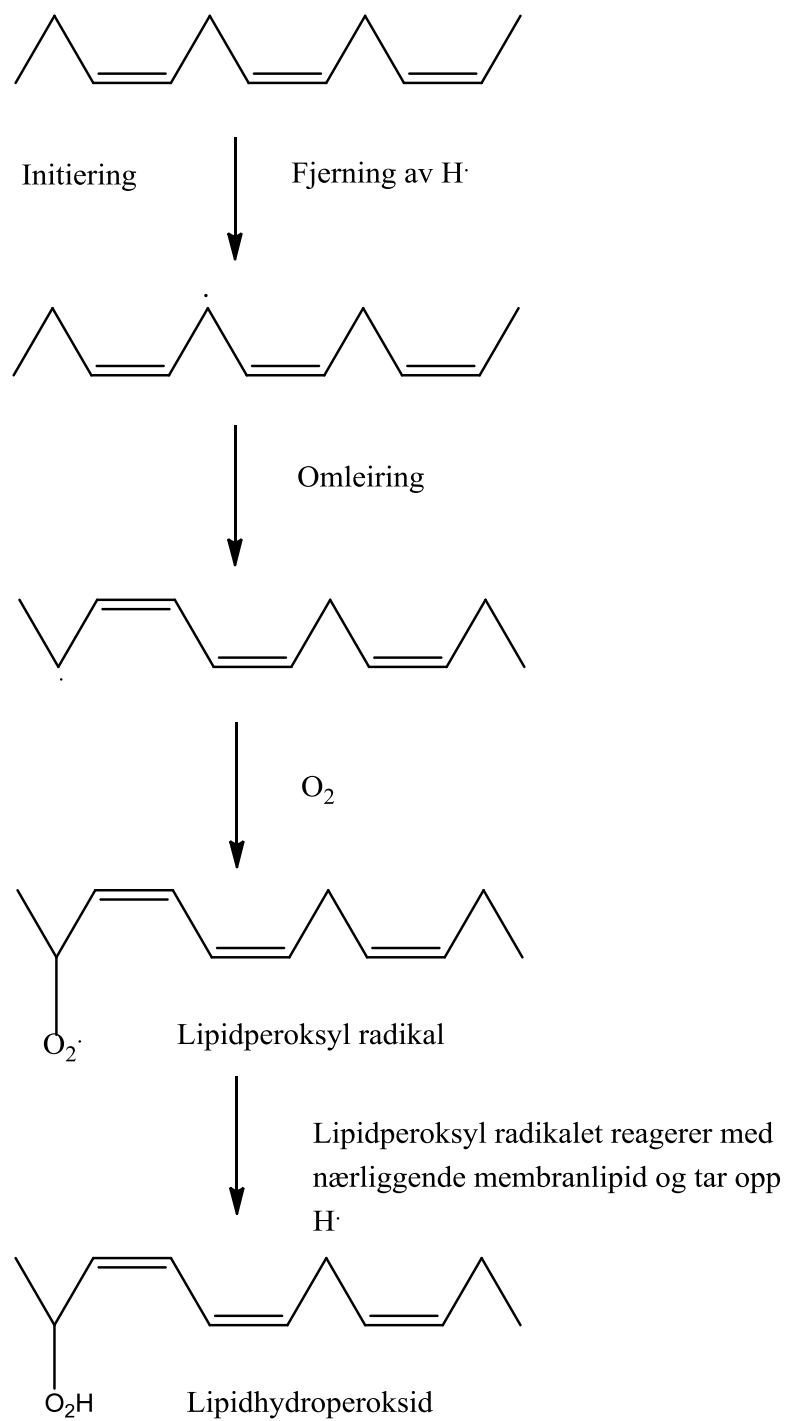
4.2.6 Lipidperoksidering

Celler og organeller er omgitt av membraner som inneholder store mengder flerumettede fettsyrer. Ved lipidperoksidering blir flerumettede fettsyrer oksidert og degradert.

Lipidperoksidering kan skje på to måter: ved en enzymatisk eller ikke-enzymatisk reaksjon. En enzymatisk reaksjon foregår ved at enzymer (cyklooksygenaser og lipoksygenaser) katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer (Halliwell og Gutteridge 2007). Dette er omtalt i avsnitt 4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase.

En ikke-enzymatisk lipidperoksidering (se figur 4.4) starter ved at en reaktiv species, for eksempel OH^\cdot radikalet, fjerner et hydrogenatom fra en metylengruppe i sidekjeden. Dette fører til dannelsen av et ustabilt karbonatom i membranen. I flerumettede fettsyrer gjennomgår ustabile karbonatomer molekylær omleiring og danner et konjugert dien. Ved reaksjon med oksygen dannes det et peroksy radikal (ROO^\cdot). Dette radikalet er reaktivt nok til å angripe nærliggende fettsyresidekjeder. Når peroksy radikalet tar opp et hydrogen blir lipidhydroperoksid (ROOH) dannet. Dette fører til kjedereaksjon (Halliwell 1991).

Akkumulering av lipidhydroperoksider i en membran kan forstyrre membranfunksjonen og føre til at membranen kollapser. I tillegg kan lipidhydroperoksider nedbrytes og gi opphav til en rekke cytotoksiske produkter som malondialdehyd og 4-hydroksynonenal (Halliwell og Gutteridge 2007).



Figur 4.4: Lipidperoksideringskaskade (Halliwell 1991)

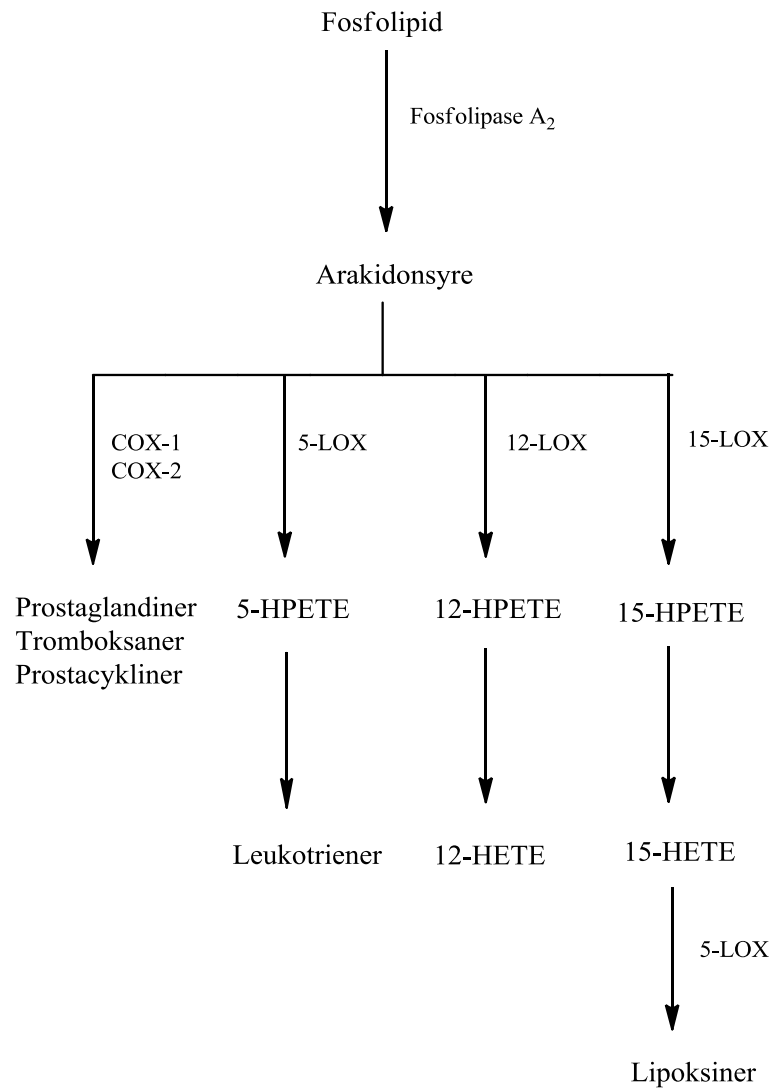
4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

Arakidonsyre er en flerumettet fettsyre i cellemembranen som blir frigjort enten i en ett-trinnsprosess eller en totrinnsprosess (se figur 4.5). I begge prosessene blir arakidonsyrer avspaltet fra fosfolipider av enzymet fosfolipase A₂, men i totrinnsprosessen kan arakidonsyrer også bli frigjort ved hjelp av fosfolipase C og diacylglycerol lipase. Arakidonsyrer omdannes deretter enzymatisk til eikosanoider via flere reaksjonsveier:

- Cyklooksxygenaser (COX) oksiderer arakidonsyrer til prostaglandiner, tromboksaner og prostacykliner
- Lipoksygenaser (LOX) oksiderer arakidonsyre til leukotriener, lipoksiner, hydroperoksyekosatetraensyrer (HPETE) og hydroksyeikosatetraensyrer (HETE)

Eikosanoider regulerer fysiologiske prosesser og spiller en nøkkelrolle ved inflammasjon.

COX består av COX-1 som finnes i nesten alle celler og COX-2 som blir indusert ved inflammatorisk stimuli. COX-2 er derfor mer relevant for behandling av inflammasjon (Rang et al. 2007). LOX finnes i både planter og dyr. De eksisterer i ulike subtyper som 5-LOX, 12-LOX og 15-LOX. 15-LOX er interessant fordi den kan oksidere forestrede fettsyrer i membraner og lipoproteiner, og gir opphav til 15-HPETE fra arakidonsyre og 13-hydroperoksy-oktadekadien syre (HPODE) fra linolsyre. I tillegg kan 15-LOX være involvert i oksidasjon av low density lipoprotein, en prosess som er viktig i utvikling av aterosklerose (Lapenna et al. 2003).

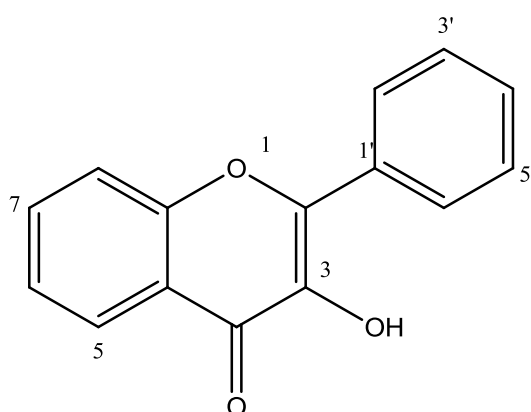


Figur 4.5: Arakidonsyremetabolisme. LOX= lipoksygenase, COX= cyklooksygenase, HPETE= hydroperoksyekosatetraensyre, HETE= hydroksyeikosatetraensyre (Rang et al. 2007)

4.4 Flavonoider

Flavonoider er gode antioksidanter. Studier har vist at struktur-aktivitetsforhold spiller en viktig rolle i bestemmelse av hvilke komponenter som kan gi en antioksidant- eller antiradikaleffekt.

Flavonoider er en undergruppe av polyfenoler og finnes i planter. Flavonoidene kan deles inn i undergrupper som flavanoler, flavonoler (se figur 4.6), flavoner, flavanoner, isoflavoner og anthocyanidiner. Disse inneholder to eller flere aromatiske ringer, hvor hver av de bærer minst et aromatisk hydroksyl og er koblet sammen ved hjelp av en karbon-bro (Beecher 2003). Den gode antioksidant-og antiradikaleffekten skyldes delvis substitusjonen ved 3'-og 4'-posisjonen (katekolstruktur) i B-ring. Hydroksylgruppene i B-ring donerer hydrogen og et elektron til hydroksyl, peroksy og peroksynitritt radikaler. Slik blir radikalene stabilisert og det blir dannet et stabilt flavonoidradikal. A-ring substitusjon har lite å si for antioksidant aktiviteten. C-ring bidrar til antioksidant aktivitet når det er koblet til en hydroksylgruppe ved 3-posisjonen, og tillater konjugasjon mellom de aromatiske ringene.



Figur 4.6: Generell flavonolstruktur med nummering. Quercetin og kaempferol er eksempler på flavonoler.

Flavonoid aglykoner er sterkere antioksidanter enn deres korresponderende glykosider. Det er rapportert at antioksidant aktiviteten til flavonolglykosider reduserer med økende antall glykosidenheter. Posisjon og struktur av sukkeret spiller også en rolle. For eksempel vil scavenging aktiviteten til et flavonoid være lavere med rhamnose enn med rutinose (Heim et al. 2002).

Det finnes flere typer LOX som katalyserer lipidperoksidationsreaksjonen. Forskjellige flavonoider utøver forskjellige hemmingsaktiviteter på de ulike enzymene. For eksempel vil oksidasjon forårsaket av 15-LOX bli hemmet av quercetin, som er en flavonol, men ikke av et flavon. Det er vist at flavonoider hemmer LOX gjennom jernreduksjon eller ved chelatering. Aktiviteten til flavonoider skjer også via scavenging av LOX-aktiverende hydroperoksider eller andre ROS oksidanter. Noen flavonoider er også hemmere av xantin oksidase selv om de ikke har like god hemmingseffekt som den kjente XO hemmeren allopurinol.

Hemmingsaktiviteten av flavonoider på XO er blant annet avhengig av 2,3-dobbelbindingen i C-ringen. Hydroksylgrupper i ortoposisjon i B-ringen og ved 3-posisjon i C-ringen synes ikke å ha noen betydning for hemmingsaktiviteten. Dessuten vil glykosylering redusere aktiviteten av flavonoider (Mladenka et al. 2010).

Flavonoider av catechintype kan polymerisere til store molekyler. Disse polymerene kalles kondenserte tanniner (proanthocyanidiner). Tanniner er delt inn i to grupper: hydrolyserbare og kondenserte tanniner. Hydrolyserbare tanniner er estere av vanligvis et sukker og et ulikt antall fenoliske syrer. Når den fenoliske syren er gallesyre, blir det kalt gallotanniner (Beecher 2003). Antioksidant-og antiradikaleffekten til et tannin er avhengig av molekylvekten til tanninet og antall galloylgrupper bundet til molekylet. Det er vist at scavenger aktiviteten til tanniner øker med påvirkningen av galloylgrupper. I tillegg ble det vist at høymolekylære tanniner har sterkere hemmingsaktivitet enn lavmolekylære tanniner. Antioksidant-og antiradikaleffekten kan forklare noe av de biologiske aktivitetene til tanniner. Disse inkluderer antitumor- og antiviral aktiviteter, og hemming av lipidperoksidering (Yokozawa et al. 1998).

5 Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
1-butanol	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Acetonitril HPLC-kvalitet	Lab-Scan Poch SA, Sowinskiego, Polen
Boratbuffer (0.2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Ceric (1% cerium(IV) sulfat i 10% svovelsyre)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Deuterert aceton (aceton-d ₆)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Deuterert kloroform (kloroform-d)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Deuterert metanol (metanol-d ₄ eller CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Difenylpikrylhydrazyl	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Etylacetat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Gallesyre	Sigma-aldrich, St.Louis, USA
Hypoxantin	Sigma-chemical company, St.Louis, USA
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Lipoksidase (type 1-B fra soyabønne)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol Chromosolv for HPLC	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Natriumkaliumfosfatbuffer (0.05 M, pH 7.5)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Nitrogengass	AGA, Oslo, Norge
Sephadex LH-20	Pharmacia, Uppsala, Sverige
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trifluoreddiksyre (TFA)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Tyskland
Tungtvann (D ₂ O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Quercetin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Quercetin-3-O-rhamnopyranosid	Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge
Xantin oksidase (XO) fra kumelk	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

5.1.2 Apparat

Apparat	Produsent
<i>Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)</i> Elueringskar Normalfase plate silikagel 60F ₂₅₄ TLC-aluminiumsplate RP-18 F ₂₅₄ S TLC silikagel RP-18 60 F ₂₅₄ S TLC sprayer GW-1	Camag, Muttenz, Tyskland Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
<i>Filter</i> HPLC solvent/sample filter Syringe driven filter, Millex-FG S&S rundfilter 240 mm Whatman 15.0 cm silikonbehandlet filterpapir Whatman nr.1 filterpapir	Chiron, Trondheim , Norge Millipore, County Cork, Ireland Dassel, Germany Maidstone, England Maidstone, England
<i>Kolonnekromatografi</i> <i>Analytisk HPLC</i> Elite LaChrome Hitachi Autosampler 1-2200 Elite LaChrome Hitachi Diodearray detektor Elite LaChrome Hitachi Kolonne ovn 1-2300 Elite LaChrome Hitachi Organizer Elite LaChrome Hitachi Pumpe 1-2130 HPLC forkolonne RP-18e 5 x 4.6 mm Chromolith RP-18e 100x 4.6 mm Varian Microsorb-MV 100-5 C18 250 x 4.6 mm kolonne <i>Preparativ HPLC</i> Sprøyte (Microliter syringes) Varian Dynamax 250 x 21.4 mm Microsorb 60-8 C18 kolonne Varian Microsorb-MV 60-8 C18 250 x 21.4 mm kolonne Varian Prostar detektor Varian Prostar modell 210 Pumpe A Varian Prostar modell 210 Pumpe B <i>Sephadex</i> Kolonne 25x2,5 cm Perimax pumpe	Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Palo Alto, California, USA Hamilton, Bonaduz, Sveits Palo Alto, California, USA Palo Alto, California, USA Palo Alto, California, USA Palo Alto, California, USA Palo Alto, California, USA Pharmacia, Uppsala, Sverige Spetec GmbH, Erding, Tyskland

<i>Versaflash</i>	
Kolonne Versapak C ₁₈ -kolonne 40x150mm	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Kolonne Versapak C ₁₈ -kolonne 80x300mm	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Kromatografi pumpe Büchi 681	Flawil, Sveits
Versaflash stativ	Supelco, Bellefonte, PA, USA
<i>NMR-spektroskopi</i>	
Bruker DPX 300	Rheinstetten, Tyskland
Bruker AVII 400	Rheinstetten, Tyskland
Bruker AV 600	Rheinstetten, Tyskland
<i>Oljepumpe</i>	
Modell E-lab 2	Sussex, England
<i>Pipetter og pipettespisser</i>	
Mikropipette 10µl	Herlev, Danmark
Eppendorf pipette	Hamburg, Tyskland
Eppendorf pipettespiss 2,5 ml	Hamburg, Tyskland
Finnpipette Digital 1-5 ml	Labsystems, Helsinki, Finland
Glass pasteur pipetter	VWR International, Oslo, Norge
Gilson Pipetman-pipette	Middleton, WI, USA
Gilson Pipettespisser	Middleton, WI, USA
<i>Rotavapor</i>	
Varmebad IKA® HB10 Basic	Staufen, Tyskland
Vakuumpumpe IKA® RV10 Basic	Staufen, Tyskland
<i>Ultralydbad</i>	
Ultrasonic cleaner 230V/50-60Hz	VWR, Leuven, Belgia
<i>UV-lampe</i>	
Modell CC-10	Upland, California, USA
<i>UV-spektroskopi</i>	
Biochrom Libra S32 PC	Cambridge, England
Kvartskyvetter	Essex, England
<i>Varmeskap</i>	
Heraeus oven, type T6	Hanau, Tyskland
Heraeus, type UT6	Hanau, Tyskland
<i>Vekt</i>	
Mettler PB 3002	Greifensee, Sveits
Sartorius BP 221S	Goettingen, Tyskland
Sartorius ED224S	Goettingen, Tyskland

5.2 Metoder

5.2.1 Generelle metoder

5.2.1.1 Innveiing

Analysevekt eller overskålsvekt ble brukt avhengig av mengde som skal veies.

5.2.1.2 Filtrering

Sprøytefilter eller papirfilter ble brukt avhengig av hvilken separasjonsmetode som ble benyttet.

5.2.1.3 Inndamping

Løsemiddel i ulike ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner ble dampet inn til tørrhet ved 40 °C under vakuum på rotavapor.

5.2.1.4 Fjerning av løsemiddelrester

Løsemiddelrester i kolber ble fjernet ved bruk av en oljevakuumpumpe (5-30 minutter).

5.2.1.5 Vannkvalitet

Destillert vann ble benyttet.

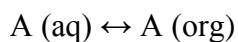
5.2.2 Separasjonsmetoder

5.2.2.1 Væske-væske ekstraksjon

Prinsipp:

Væske-væske ekstraksjon benyttes til å separere eller isolere stoffer fra en væske. I denne metoden utnyttes egenskapen stoffer har til å fordele seg mellom to ikke blandbare væsker.

Den ene væsken er en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann. Når en vandig løsning som inneholder et organisk stoff A, rystes med et organisk løsemiddel, vil det raskt innstille seg en likevekt som kan beskrives med ligningen:



hvor A (aq) og A (org) beskriver hvordan A fordeles mellom vandig og organisk fase.

Fordelingen av et stoff i organisk fase og i vandig fase er avhengig av stoffets

lipofile/hydrofile egenskaper og av løsemidlets egenskaper. Den generelle regelen er at likt

løser likt, hvor upolare stoffer vil løse seg best i upolare løsemidler og polare stoffer vil løse seg best i polare løsemidler. I tillegg til oppløselighet er det viktig å ta hensyn til viskositet, tetthet og kokepunkt ved valg av løsemiddel for ekstraksjon. For å få tilstrekkelig utbytte er det viktig å ekstrahere samme prøve flere ganger. Gjentatte ekstraksjoner med små løsemiddelvolum gir større utbytte enn ved én gangs ekstraksjon med et større løsemiddelvolum (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Reagenser

Etylacetat

1-butanol

Destillert vann

Utstyr

Skilletrakt

Stativ

Filterpapir

Begerglass

Erlenmeyerkolber

Pærekolber

Prosedyre

1. Stoff suspenderes i et egnet løsemiddel og overføres til skilletrakten
2. Suspensjonen ekstraheres med 5x 300 ml løsemiddel
3. Ved ekstraksjon med et nytt løsemiddel kan den aktuelle fasen tappes ut og overføres til en ny skilletrakt. Fasen ekstraheres med 5x 300 ml av det nye løsemidlet
4. Under hver ekstraksjon blir fasene separert ved god risting på skilletrakten
5. Fasene filtreres og overføres til forhåndsveide pærekolber
6. Fasene dampes inn til tørrhet på rotavapor

5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi

Prinsipp:

Kolonnekromatografi er separasjonsmetoder som benyttes til å separere stoffer fra hverandre. Stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser, hvorav den ene fasen beveger seg (mobilfase) mens den andre fasen står stille (stasjonærfase).

I Versaflash kolonnekromatografi benyttes ferdigpakkede Versapak kolonner med polar eller upolar stasjonærfase. Prøveløsning appliseres og drives gjennom systemet med mobilfase ved hjelp av en pumpe. Separasjon av stoffer er avhengig av at stoffene har forskjellig grad av affinitet til stasjonærfasen, slik at de kommer ut av kolonnen på forskjellige tidspunkter (Greibrokk et al. 2005).

De mest brukte kolonnematerialer er normalfase-silika og omvendt-fase (C_{18} -bundet) silika (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Silika (silikagel) er den vanligste stasjonærfasen i normalfasekromatografi og består av porøse partikler med polar overflate. Silika som et porøst materiale bidrar til et stort overflateareal og gir en enorm kontaktflate med mobilfasen. Det er silanolgruppene ($Si-OH$) på silika som gjør overflaten polar og svakt sur, og er ansvarlig for adsorpsjonsegenskapene. Stoffet separeres etter hvor kraftig interaksjonen er med silika. De kraftigste interaksjonene er hydrogenbindingsinteraksjoner. Siden aminer og karboksylsyrer gir sterke interaksjoner med silika, absorberes de sterkt og kommer ut sist fra kolonnen. I normalfasekromatografi er mobilfasen vanligvis en blanding av organiske løsemidler. Styrken på mobilfasen er avhengig av polariteten på løsemidlet. En sterk mobilfase (polare løsemidler) kan bryte sterke interaksjoner, og en svak mobilfase (upolare løsemidler) kan bryte svake interaksjoner.

I omvendt-fase-kromatografi er silikabasert C_{18} -materiale den mest brukte stasjonærfasen. C_{18} -materialet har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer, og er den mest hydrofobe fasen. Stoffet retarderes på stasjonærfasen ved hydrofob interaksjon. De viktigste kreftene er van der Waals-krefter, som er relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. I en blanding av stoffer vil hydrofobe stoffer, mettede forbindelser og uioniserte forbindelser ha størst retensjon og lengst retensjonstid i kolonnen. Mobilfasen består av vann blandet med organiske løsemidler som er blandbare med vann. Eksempler på disse er metanol og

acetonitril. Styrken på mobilfasen er avhengig av mengden og typen av organisk modifikator. Hvis innholdet av organisk modifikator øker, øker styrken også slik at retensjonen avtar.

Reagenser

Metanol

Aceton

Destillert vann

Utstyr

Versapak C₁₈-kolonne

Kromatografisk pumpe

Versaflash stativ

Begerglass

Dramsglass

Prosedyre

1. Kolonnen kondisjoneres med passende mobilfase lik 3x kolonnevolum
2. Pumpen pumper mobilfasen fra et reservoar og gjennom systemet
3. Prøven løses i et lite mengde løsemiddel (= prøveløsning)
4. Prøveløsningen filtreres og appliseres på kolonnen
5. Mobilfase med økende løsemiddelstyrke brukes for å eluere ut alle stoffer
6. Fraksjoner samles opp
7. Kolonnen vaskes med 100% løsemiddel



Figur 5.1: Versaflash kolonnekromatografi ved Farmasøytisk Institutt (FI)

5.2.2.3 Sephadex LH-20 gelkromatografi

Prinsipp:

Gelkromatografi er en separasjonsmetode innen kolonnekromatografi (se avsnitt 5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi). Stasjonærfasen består av hydroksypropylert dekstran gel Sephadex LH-20 (Henke 1995). Dekstraner er polysakkarider som består av glukoseenheter sammenbundet ved eterbindinger. Sephadex dekstran gel blir laget ved tverrbinding av polydekstraner med epiklorhydrin.

Prinsippet for Sephadex LH-20 er å separere stoffer etter molekylstørrelse. Stasjonærfasen er porøs og har en gitt porestørrelse. Molekyler som er for store til å passere gjennom porene i stasjonærfasen, transporteres med mobilfasen mellom partiklene og ut av kolonnen. Små molekyler går inn i porene og får en lengre vei å gå, og derfor har de større retensjon i kolonnen. I tillegg har Sephadex LH-20 sterkt adsorptive egenskaper ovenfor aromatiske forbindelser (Greibrokk et al. 2005). Sephadex LH-20 kan anses som en universell stasjonærfase i gelkromatografi fordi den viser samme svelling-kapasitet i vann, metanol og diklormetan (Henke 1995).

Reagenser

Metanol

Destillert vann

Utstyr

Kolonne

Sephadex LH-20 gel

Stativ

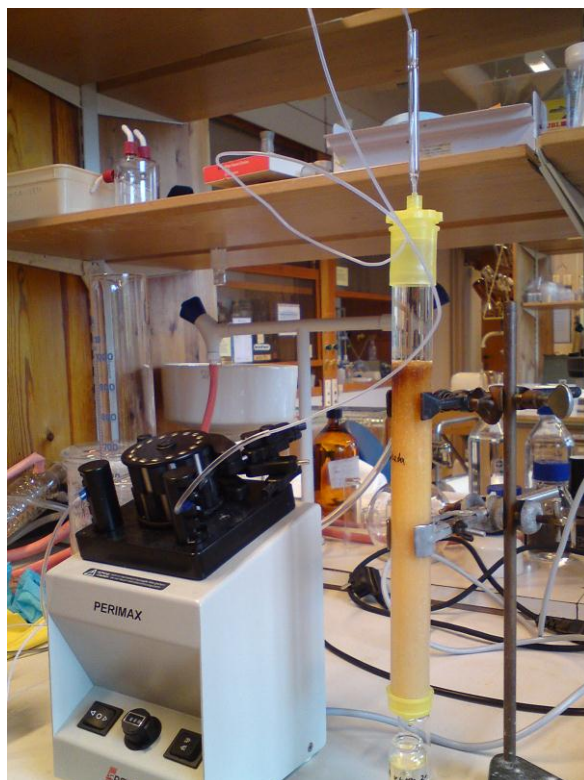
Glass pasteur pipetter

Begerglass

Dramsglass

Prosedyre

1. Sephadex LH-20 suspenderes og svelles i passende starteluent
2. Kolonnen monteres vertikalt på stativet
3. Kolonnen fylles med oppsvulget Sephadex LH-20. God separasjon er avhengig av at Sephadex LH-20 er pakket jevnt i kolonnen
4. Kolonnen vaskes med 150 ml starteluent
5. Prøven løses i et lite volum løsemiddel (sammensetning lik starteluenten) og appliseres langs veggen på toppen av kolonnen med en pipette
6. Prøve og mobilfase elueres gjennom kolonnen ved hjelp av en pumpe
7. Det blir brukt elueringsmiddel med økende løsemiddelstyrke for å eluere ut stoffene
8. Fraksjoner samles opp
9. Kolonnen vaskes med 100% metanol



Figur 5.2: Sephadex LH-20 ved FI

5.2.2.4 Væskekromatografi (HPLC)

Prinsipp:

I væskekromatografi (high performance liquid chromatography= HPLC) er prinsippet relativt likt som for Versaflash kolonnekromatografi og gelkromatografi. Metodene baserer seg på at mobilfasen og prøveløsningen presses gjennom systemet ved hjelp av en pumpe. Når prøveløsningen kommer til kolonnen blir stoffer i prøveløsningen retardert og separert. I HPLC blir stoffene som kommer ut av kolonnen detektert av en detektor som er koblet til systemet.

I denne metoden er kolonnen pakket med stasjonærfase for normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi eller gelkromatografi (se avsnitt 5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi og avsnitt 5.2.2.3 Gelkromatografi). Det blir brukt mobilfase som består av ett eller flere løsemidler. Under analysen kan mobilfasen elueres på to måter, enten ved isokratisk eluering (sammensetning av mobilfasen er konstant) eller ved gradienteluering (sammensetning av mobilfasen endrer seg). Dersom en prøveløsningen består av stoffer som har stor forskjell i retensjonstid blir gradienteluering anvendt (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

HPLC kan brukes analytisk eller preparativt. For å få god separasjon av stoffene i preparativ HPLC brukes vanligvis analytisk HPLC til å finne en passende sammensetning av mobilfasen. Analytisk HPLC benyttes også for å sjekke om en prøve er ren eller for å detektere bestemte stoffer ved ulike bølgelengder, eller for kvantifisering.

Reagenser

Destillert vann

Metanol av HPLC-kvalitet

Acetonitril av HPLC-kvalitet

Trifluoreddiksyre

Utstyr

HPLC-apparat med tilhørende utstyr

Sprøyte og sprøytetrevet filter

Vial

Dramsglass

Prosedyre 1

1. Ved analytisk HPLC kondisjoneres kolonnen med mobilfasen (lik starteluent) i 20 minutter
2. Pumpene suger mobilfasen fra to reservoarer (gradienteluering) og pumper mobilfasen med konstant hastighet gjennom systemet
3. Prøven løses i et lite volum starteluent (= prøveløsning)
4. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler, fylles i vial og plasseres i autosampler
5. Injeksjonsvolumet på hver prøveløsning er vanligvis på 40 µl
6. Stoffet i prøveløsningen detekteres av detektoren
7. Kolonnen vaskes med 50% vandig metanol

Prosedyre 2

1. Ved preparativ HPLC kondisjoneres kolonnen med mobilfasen (lik starteluent) i 30 minutter (~10x kolonnevolum).
2. Pumpene suger mobilfasen fra to reservoarer (gradienteluering) og pumper mobilfasen med konstant hastighet gjennom systemet

3. Prøven løses i et lite volum av starteluent (= prøveløsning)
4. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler og ca. 1 ml prøveløsning injiseres
5. Stoffer i prøveløsningen kommer ut av kolonnen og detekteres av detektoren
6. Fraksjoner samles opp basert på detektorresponsen
7. Kolonnen vaskes

5.2.3 Identifikasjonsmetoder

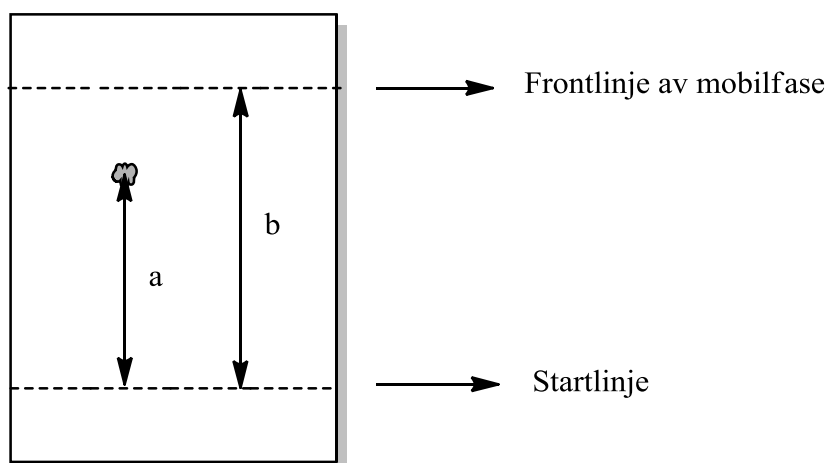
5.2.3.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi

Prinsipp:

Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography= TLC) er en enkel og rask separasjonsmetode. I denne metoden er stasjonærfasen (vanligvis silika eller C₁₈) spredt som et tynt lag utover en plate. Prøveløsningen appliseres på platen langs en startlinje på ca. 2 cm fra platekanten. Platen plasseres i et lukket kar som inneholder mobilfasen, og stoffene i prøveløsningen elueres med mobilfasen oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Platen fjernes fra karet når mobilfasen nærmer seg den øvre platekanten. Stoffene påvises på platen ved hjelp av UV-lampe og/eller av fargereagenser (se avsnitt 5.2.3.5 Ceric-spraying og avsnitt 5.2.3.6 DPPH-spraying).

Vandringen oppover platen er avhengig av stoffenes egenskaper og av styrken til mobilfasen. Stoffer som har sterkest interaksjon med stasjonærfasen vil retardere mest på platen.

Retensjonen av stoffene angis som retensjonsfaktor (R_f). R_f -verdien defineres som $R_f = a/b$, hvor a er avstanden fra startlinjen til midten av flekken og b er avstanden mellom startlinjen og frontlinjen av mobilfase (se figur 5.3).



Figur 5.3: En TLC-plate med parametere til bestemmelse av R_f -verdi (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

I TLC består stasjonærfasen av silika som i normalfasekromatografi eller omvendt-fasekromatografi (se avsnitt 5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi og avsnitt 5.2.2.3 Gelkromatografi). I tillegg kan stasjonærfasen være blandet med fluorescensindikator for enklere å påvise stoffer som absorberer UV-stråling. Mobilfasen består av et organisk løsemiddel eller en blanding av vann og et organisk løsemiddel. Lav løsemiddelstyrke gir sterk retensjon og høy løsemiddelstyrke gir liten retensjon (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Reagenser

Destillert vann

Metanol

Utstyr

Et glasskar med tett lokk

Mikropipette

TLC-plate

UV-lampe/ fargereagens

Prosedyre

1. En passende mobilfase overføres til glasskaret, og den skal rekke 1-1.5 cm opp i karet. Deretter lukkes karet med et lokk i 10-30 minutter, slik at det innstiller seg en likevekt mellom mobilfasen og dampen av mobilfasen
2. En startlinje (ca. 2 cm fra nedre kant) merkes av med en blyant på TLC-platen
3. Prøvene løses i et flyktig løsemiddel. Ofte er stoffene allerede løst i mobilfase etter separasjon i kolonne før TLC tas i bruk
4. Prøveløsningene avsettes som små flekker (ca. 5 µl) på den avmerkede blyantstreken og avstanden mellom flekkene skal være minst 1 cm
5. Platen settes vertikalt ned i det lukkede karet
6. Når mobilfasen nærmer seg den øvre kanten tas platen ut av karet. Frontlinjen merkes av med blyanten
7. Mobilfasen dampes av ved lufttørking
8. Fargede stoffer blir synlige, mens UV-absorberende eller langbølgefluorescerende stoffer kan påvises ved bestråling med UV-lys ved 254 nm eller 366 nm. Andre stoffer kan påvises ved behandling med fargereagens
9. Fraksjoner blir slått sammen utifra flekkenes størrelse, farge og intensitet

5.2.3.2 Analytisk HPLC

Prinsipp, reagenser og prosedyre er beskrevet i kap. 5.2.2.4.

5.2.3.3 NMR-spektroskopi

Prinsipp:

NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance) er en viktig analytisk metode for strukturoppklaring av organiske forbindelser.

Kjerner av hydrogen (^1H), karbon (^{13}C) og en del andre atomer oppfører seg som om de var magneter og spinner rundt sin egen akse. I fravær av et magnetfelt vil de være vilkårlig orientert. Når de plasseres i et sterkt magnetfelt og samtidig bestråles med elektromagnetisk energi vil kjernene absorbere energien gjennom en prosess som kalles magnetisk resonans. Det som skjer når kjerner blir utsatt for et ytre magnetfelt er at de vil få en av to mulige orienteringer i forhold til det ytre magnetfeltet. De vil enten orientere seg med feltet (α spinn-tilstand) eller mot feltet (β spinn-tilstand). Kjerner som er ordnet med det magnetiske feltet har lavere energi enn de mot feltet. Energi er nødvendig for å kunne flippe kjernene fra lavere

energitilstand til høyere energitilstand. I NMR-spektrometer blir denne energien tilført i form av et roterende elektromagnetisk felt. Når denne energien blir absorbert, sier man at kjernene er i resonans med den påførte elektromagnetiske strålingen.

^1H NMR-spektre viser ulike signaler og hvert signal svarer til antall unike sett av protoner som fins i et molekyl. Signalene til protonene vil oppstå i ulike posisjoner (de har ulike kjemiske skift). Posisjonene vil avhenge av elektrontettheten og elektron-sirkulasjonen i molekylet. Ved påvirkning av et ytre magnetfelt vil elektronene danne et induisert magnetfelt som motvirker det ytre magnetfeltet. Elektronene utgjør en elektronsky og gir protonet en skjermingseffekt (shielding) mot det ytre magnetfeltet. Et proton som er sterkt skjermet av elektroner "føler" mindre av det ytre magnetfeltet og vil absorbere ved høyere frekvens sammenliknet med et proton som er mindre skjermet (deshielding). Elektrontettheten er oftest avhengig av tilstedeværelsen av elektronegative grupper. Elektronegative grupper trekker elektrontettheten fra protonet og gir en deshieldings effekt. Sirkulering av delokaliserte π -elektroner danner også et magnetfelt som gir shieldings- eller deshieldings effekter (Solomons og Fryhle 2004).

NMR-spektre måles i en δ -skala i enheter av ppm (parts per million). δ -skalaen for ^1H NMR går vanligvis fra 0-14 ppm. Høyere frekvenser er til venstre i spektret og signaler som finnes her sies å være downfield. De får en høyere ppm verdi (ofte 5-10 ppm). Lavere frekvenser er til høyre i spektret. Signalene sies å være upfield og får en lavere ppm verdi (0-2 ppm). Den mest brukte referansesubstansen er TMS (tetrametylsilan) og utgjør nullpunktet på δ -skalaen (Hansen 2010).

For å skaffe informasjon om strukturen til en forbindelse må man tolke spektrene. Ved tolkning av ^1H -spektret er det viktig å se på:

- Integreringskurve: Integreringskurven sier noe om størrelsen på signalet, spesielt viktig er arealet under signalet. Forholdet mellom arealene skal tilsvare forhold mellom antall hydrogenatomer i hvert signal. Høyden av integralkurvene er proporsjonal med arealene under signalene
- Signal splitting: Signalet fra et gitt proton vil bli splittet som følge av effekten av magnetfelt assosiert til protoner på nærliggende atomer. Signal splitting blir observert når protonene er separert med 3 eller færre σ -bindinger og når det er ulike sett av protoner med ulike kjemisk shift (ikke kjemisk ekvivalente). Hvis det er n ekvivalente

protoner på nærliggende atomer, vil disse splitte et signal i $n+1$ topper. Svært nærliggende signaler vil splittes annerledes (høyere orden spektre)

- Koblingskonstant: Dersom et signal er splittet i flere topper kaller vi avstanden mellom toppene for koblingskonstanten. Verdien til koblingskonstanten er gitt i Hertz. Koblingskonstanten blir brukt for å lettere identifisere komplekse spektra

I ^{13}C NMR går δ -skalaen vanligvis fra 0 til ca. 220 nm. Som for ^1H NMR vil kjemisk skiftverdier av en gitt karbonkjerne avhenge av elektrontettheten rundt kjernen. Karbon-karbon signal splitting ses vanligvis ikke i ^{13}C -spekter, men hydrogenatomer bundet til karbon kan splitte ^{13}C NMR signalene til flere topper. Tolkningen av et ^{13}C -spekter blir forenklet ved å eliminere signal splitting for ^1H - ^{13}C kobling. Slik produserer hvert unike karbonatom i et gitt organisk molekyl kun en topp i spektret (Solomons og Fryhle 2004).

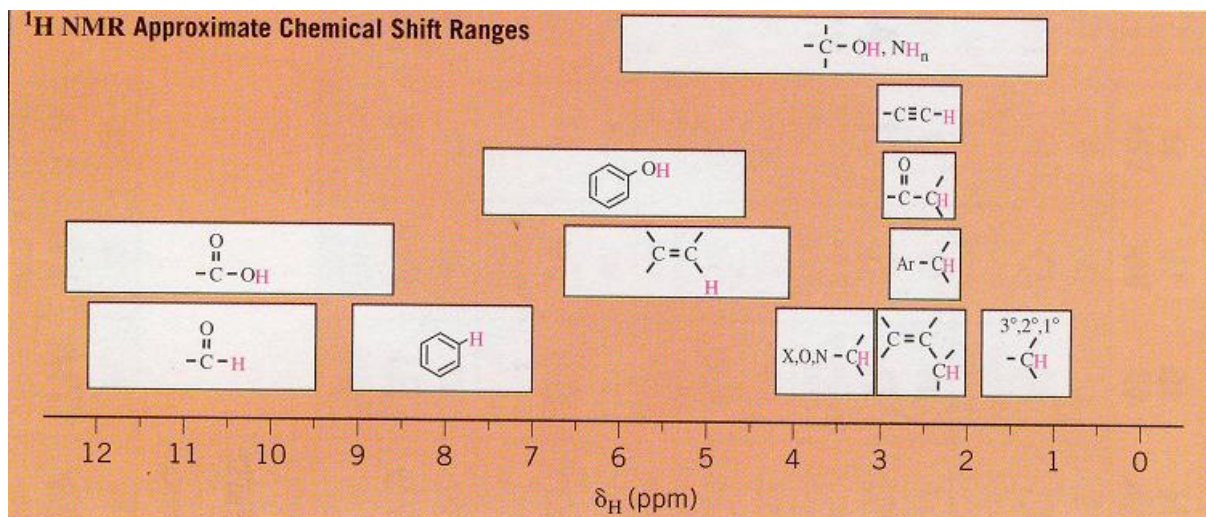
APT (attached proton test) er en metode som benyttes for å sortere karboner etter antall bundet hydrogenatom, og slik får vi en visuell identifikasjon av substitusjonsmønstret til alle karboner. I et APT spekter vil $-\text{C}$ og $-\text{CH}_2$ få positive topper slik at de vil peke oppover, mens $-\text{CH}$ og $-\text{CH}_3$ vil få negative topper og de vil peke nedover (Lambert og Mazzola 2004).

^1H NMR, ^{13}C NMR og APT er metoder innen 1-dimensjonell NMR spektroskopi. Teknikker som baserer seg på 2-dimensjonell spektroskopi er blant annet COSY (correlation spectroscopy), HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) og HSQC (heteronuclear single quantum coherence):

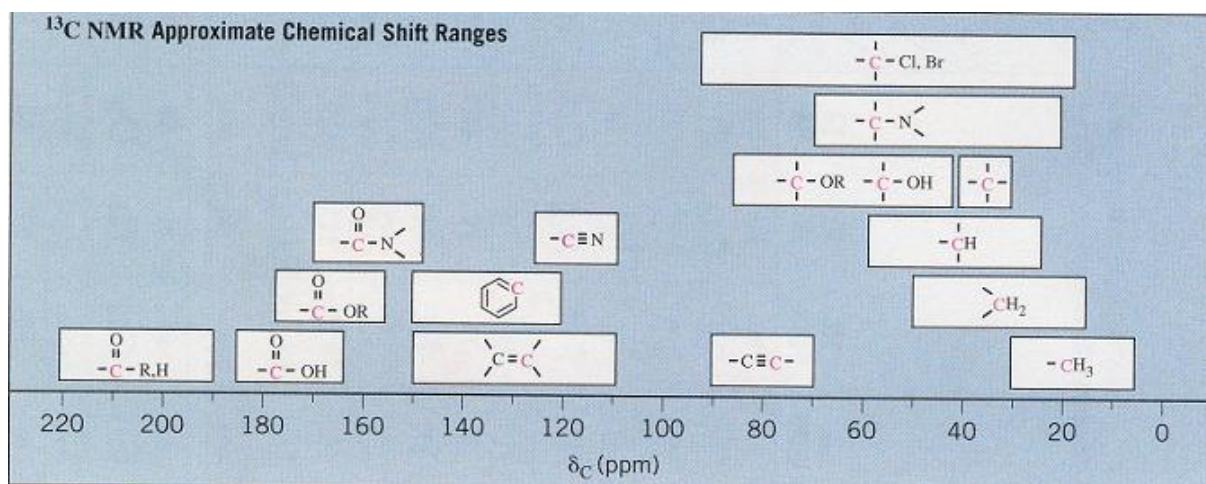
Ved bruk av COSY er det mulig å finne hvilke protoner som kobler med hverandre uten at vi trenger å identifisere koblingskonstanter. I et COSY-spekter blir det ordinære 1-dimensjonelle ^1H -spektret vist både langs den horisontale og vertikale aksene. Signaler vises langs en diagonal i spektret. Vi kan tegne diagonalen for å forbinde signalene slik at tolkningen av spektret blir enklere. Når to protoner er koblet med hverandre vil de danne kryssstopper som står vinkelrett på diagonalen (Solomons og Fryhle 2004; Hansen 2010).

HMQC viser koblingen mellom ^{13}C og ^1H som ligger en bindingsavstand fra hverandre (Breitmaier 2002). Her blir det brukt invers deteksjon, hvor ^{13}C responser er observert i ^1H -spektret.

HSQC er et annet alternativ til HMQC. Disse to metodene gir samme resultat men HSQC benytter en annen pulssekvens i forhold til HMQC (Breitmaier 2002). I tillegg inneholder ikke HSQC-spekter ^1H - ^1H koblinger i ^{13}C dimensjon. Det gjør at HSQC krysstopper får en bedre oppløsning (Lambert og Mazzola 2004).



Figur 5.4: ^1H NMR kjemisk skift verdi (Solomons og Fryhle 2004)



Figur 5.5: ^{13}C NMR kjemisk skift verdi (Solomons og Fryhle 2004)

Reagenser

TMS

Deuterert aceton (aceton- d_6)

Deuterert kloroform (kloroform-d)

Deuterert metanol (CD_3OD)

Deuterert tungtvann (D_2O)

Utstyr

NMR-spektrometer

NMR-rør med lokk

Prosedyre

1. 1 % TMS tilsettes i beholderen til det deutererte løsemidlet
2. Passende volum av løsemidlet pipetteres over til en liten mengde (vanligvis 1-50 mg) prøve
3. Oppløst prøve overføres til NMR-rør (skal fylle ca 4 cm opp i røret) og lokket settes på
4. Prøveløsningen analyseres i NMR-spektrometer

5.2.3.4 UV-spektroskopi

Prinsipp:

UV-stråling er elektromagnetisk stråling i bølgelengdeområdet 200-400 nm. Når det sendes elektromagnetisk stråling mot molekyler i en løsning, vil man observere at intensiteten til strålingen svekkes ved passasje gjennom prøveløsningen. Svekkelsen av elektromagnetisk stråling vil være kraftig ved noen bølgelengder, mens strålingen ved andre bølgelengder vil passere stort sett uhindret gjennom prøveløsningen. Strålingen svekkes fordi molekylene absorberer elektromagnetisk stråling. Molekyler er normalt tilstede i sin laveste energitilstand, som kalles grunntilstanden. Når molekyler absorberer elektromagnetisk stråling, dannes eksiterte molekyler med høyere energi. Eksiterte molekyler er svært ustabile, og vil i løpet av kort tid kvitte seg med overskuddsenergien. Denne sendes vanligvis ut igjen som varme eller som elektromagnetisk stråling (fluorescens).

Organiske forbindelser som inneholder dobbelt-eller trippelbindinger vil gi absorbans i UV-spektroskopi. Disse elektronene sitter mye løsere og krever mindre energi for å eksitere. UV-lys med bølgelengder over 200 nm inneholder nok energi til å eksitere denne typen elektroner.

Ved bruk av UV-spektroskopi er det viktig å velge et egnet løsemiddel som løser testsubstansen. Bunnfall i løsningen kan føre til spredning av UV-stråling og feil på absorbansmåling. I tillegg bør løsemidlet ikke absorbere lys i bølgelengdeområdet som skal

benyttes til absorbansmålingene. Dersom prøveløsningene skal måles i UV-området må kvartskyvetter benyttes siden de ikke absorberer elektromagnetisk stråling (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Reagenser

Løsemiddel

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Prosedyre

1. Spektrofotometeret innstilles ved ønsket bølgelengde
2. Blindprøve plasseres i blindprøveholder
3. Prøven løses i egnet løsemiddel og overføres til kvartskyvetten (vanligvis 3 paralleller)
4. Absorbansmålinger starter umiddelbart

5.2.3.5 Ceric-spraying

Prinsipp:

Cerium(IV)sulfat har evne til å oksidere andre stoffer, spesielt under sure betingelser (Omastová et al. 2010). Oksidasjonen fører til forkoksing og fargedannelse. Hvilken farge som dannes er avhengig av hvilket stoff det reagerer med på TLC platen. Ceric-spraying blir brukt for å avgjøre hvilke fraksjoner som slås sammen etter fraksjonering med kromatografiske metoder.

Reagenser

Cerium(IV)sulfat 1% løst i 10% vandig svovelsyre

Utstyr

TLC-sprayer

Varmeskap

Prosedyre

1. 1 g ceriumsulfat løses i en blanding av 90 ml destillert vann og 10 ml konsentrert svovelsyre
2. Ceric-reagens fylles i spraybeholder
3. Ca. 5 µl prøveløsning appliseres på en TLC plate
4. Ceric-reagens sprayeres jevnt utover platen
5. TLC platen legges i varmeskapet i ca. 10 minutter ved 100-110 °C. Oppvarming i varmeskapet gir en raskere reaksjon
6. Resultatet avleses visuelt

5.2.3.6 DPPH-spraying

Prinsipp:

Det er samme prinsipp for DPPH-spraying som for DPPH-scavenging (se avsnitt 5.2.4.1 DPPH-scavenging). Prøveløsninger blir applisert på TLC platen og de prøveløsningene som inneholder stoffer med radikalscavengereffekt vil danne gule flekker mot lilla bakgrunn. Dette kan detekteres visuelt (Braca et al. 2002). DPPH-spraying benyttes for å bestemme hvilke fraksjoner som slås sammen etter fraksjonering med Versaflash, Sephadex eller preparativ HPLC.

Reagenser

DPPH-pulver

Metanol

Utstyr

TLC-sprayer

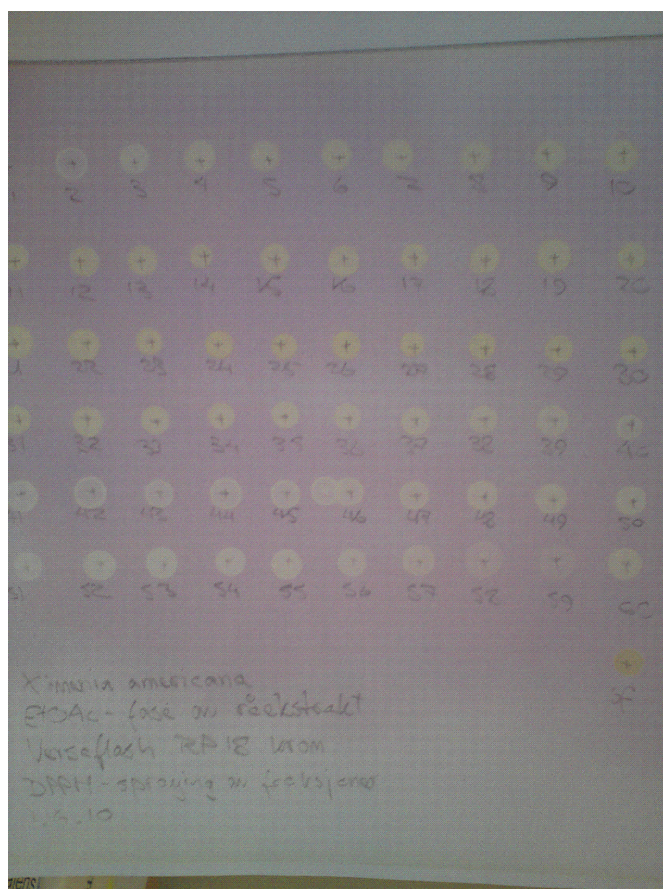
TLC plate

Magnet og magnetrører

Prosedyre

1. DPPH-pulver (40 mg) løses i 100 ml metanol (0.4 mg/ml) ved hjelp av magnet og magnetrører
2. DPPH-løsningen overføres til TLC-sprayer
3. Ca. 5 µl prøveløsning appliseres på TLC-platen
4. DPPH-løsningen sprayeres jevnt utover TLC-platen

5. Etter noen minutter kan resultatet avleses visuelt



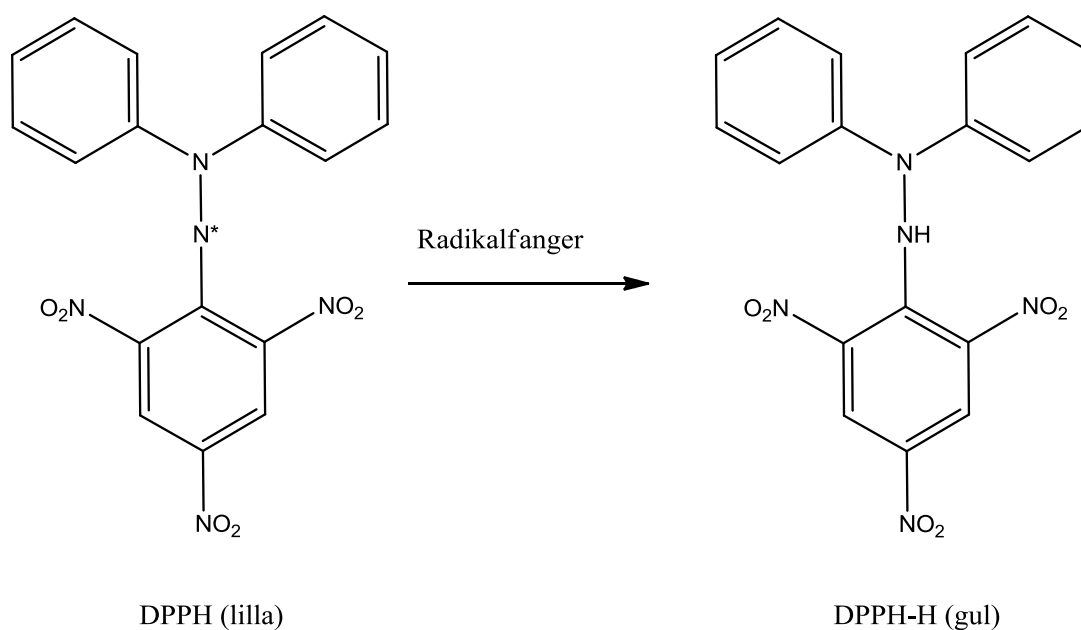
Figur 5.6: Tynnsjiktplate sprayet med DPPH-løsningen

5.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

5.2.4.1 DPPH-scavenging

Prinsipp:

Difenylpikrylhydrazyl (DPPH) er et stabilt fritt radikal. På grunn av sitt uparede elektron har DPPH en dyp fiolett farge i løsning og viser et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm (Blois 1958). DPPH-scavenging er en metode for estimering av antioksidantaktiviteten til en forbindelse. Når DPPH reagerer med en forbindelse som har radikalscavengereffekt, vil non-radikal formen difenylpikrylhydrazin (DPPH-H) bli dannet. Reduksjon i radikalkonsentrasjonen fører til reduksjon i absorbansverdi ved 517 nm. Dette kan også detekteres visuelt ved at fargen endrer seg fra dyp fiolett til gul (Molyneux 2004). Som positiv kontroll blir quercetin ofte anvendt da det er en god scavenger, stabilt og billig (Malterud 2009).



Figur 5.7: Omdannelse av DPPH til DPPH-H (Molyneux 2004)

Prosent DPPH-scavenging blir beregnet ved hjelp av følgende formel (Malterud 2009):

$$100 \times ((A_0 \times 2.95/3.00) - A_t) / ((A_0 \times 2.95/3.00) - A_p)$$

A_0 : startabsorbans (absorbans før tilsetning av testløsning/positiv kontroll)

A_t : absorbans med testløsning/positiv kontroll etter 5 min reaksjonstid

A_p : absorbans etter 5 min reaksjonstid hvis alt DPPH er blitt scavengert

Aktiviteten blir gitt som IC_{50} , det vil si konsentrasjonen som gir 50% scavenging .

Reagenser

DPPH

Metanol (MeOH)

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Testsubstans

Quercetin

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter/ multipipetter

Plastspatler

Magnet og magnetrører

Prosedyre

1. DPPH-pulver (4 mg) løses i 100 ml MeOH (ca 0.04 mg/ml) ved hjelp av magnet og magnetrører. Konsentrasjonen skal gi en absorbanverdi på 1.00 ± 0.05 ved 517 nm
2. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av MeOH. For å hindre fordamping settes et lokk på kyvetten. Blindprøven skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
3. Testsubstans løses i MeOH eller DMSO i ønsket konsentrasjon
4. Quercetin løses i MeOH eller DMSO og brukes som positiv kontroll
5. Startabsorbans måles ved 517 nm i 2.95 ml DPPH løsning (3 paralleller)
6. Ved $t=0$ tilsettes 50 μ l testløsning til hver parallell og omrøres med plastspatel
7. Absorbansmåling starter 30 sekunder etter tilsetning av testløsning. Reaksjonstiden er på 5 minutter
8. Kast innholdet i kyvettene etter hver måling og skyll kyvettene med MeOH

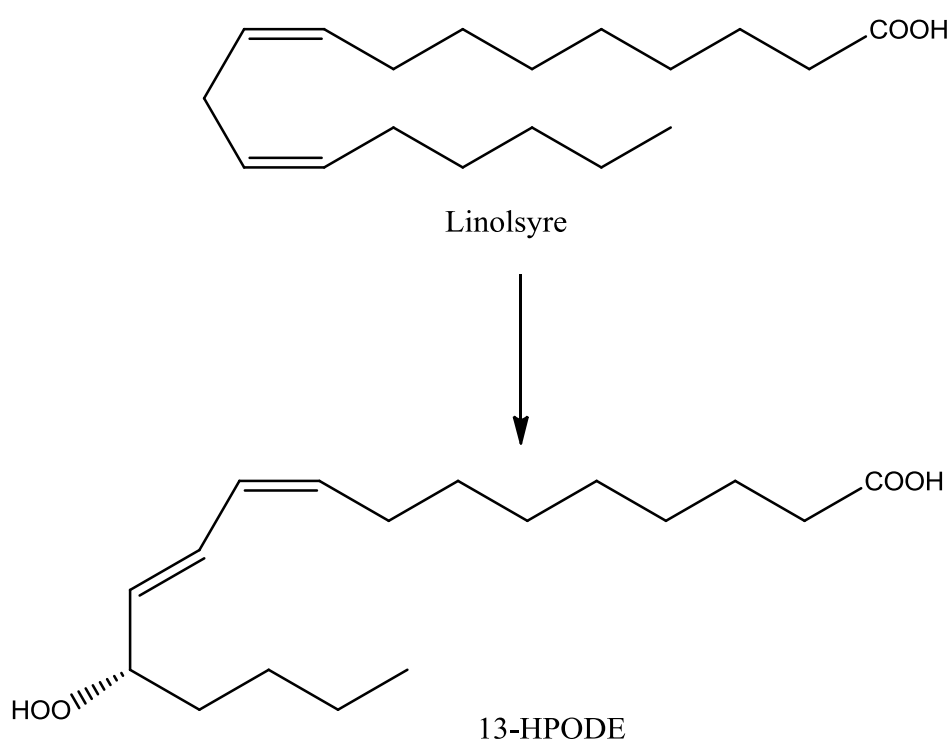
5.2.4.2 15-lipoksygenasehemming

Prinsipp:

Lipoksygenaser (LOX) er enzymer som katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer på en selektiv måte (Lyckander og Malterud 1996). Som tidligere nevnt er hemming av 15-LOX av stor interesse på grunn av dens mulige rolle i oksideringen av LDL. Denne prosessen er viktig i utviklingen av aterosklerose. I tillegg kan 12- og 15-LOX og deres metabolitter ha en viktig rolle i sykdomstilstander som diabetes (type 1 og 2), fedme, nyresykdommer og andre sykdommer i nervesystemet (Dobrian et al. 2011).

15-LOX hemming er en metode som er basert på den 15-LOX katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med en 1,4-dien-type struktur. Både arakidonsyre og linolsyre har 1,4-dien-type struktur og er egnet som substrat. Disse to substratene gir noenlunde like verdier for enzymhemming, men linolsyre blir mest brukt da den er billigere og mer stabil (Lyckander og Malterud 1990).

15-LOX finnes både i planter og dyr. I våre forsøk ble 15-LOX isolert fra soyabønner benyttet. 15-LOX katalyserer oksidasjonen av linolsyre til 13-HPODE på en effektiv måte (Lapenna et al. 2003). Peroksideringsreaksjonen måles ved at det blir dannet et konjugert dobbeltbindingssystem som fører til en økning i absorbans ved 234 nm. Denne økningen blir brukt for å bestemme mengde reaksjonsproduktet som blir dannet (Malterud et al. 1993). Ved tilsetning av en testsubstans som hemmer 15-LOX, vil absorbansøkningen reduseres. Hemmingsgraden av 15-LOX bestemmes ved å sammenligne absorbansøkningen i nærvær og fravær av en hemmer.



Figur 5.8: Peroksidering av linolsyre til 13-HPODE (Funk og Cyrus 2001)

Prosent enzymhemming blir beregnet ved hjelp av følgende formel (Malterud et al. 1993):

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/dt) - (dA_2/dt)] / (dA_1/dt)$$

dA_1/dt : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

dA_2/dt : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

Reagenser

A: Boratbuffer 0.2 M, pH 9.00. Laget av borsyre og natriumhydroksid

B: Substratløsning. Først skal 50 µl linolsyre blandes med 150 µl etanol, deretter skal det tilsettes 50 ml A. 10 ml av blandingen fortynnes med 150 ml A. Dette skal lages rett før bruk

C: Enzymløsning. 15-LOX veies ut og løses i A til en konsentrasjon på 10 000 enheter/ml (ca. 0.3-0.5 AU/min økning). Enzymløsningen skal lages rett før bruk og skal oppbevares på is under hele forsøket

D: Testsubstans. Løs stoffet i DMSO i ønsket konsentrasjon

Quercetin (positiv kontroll)

DMSO

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter/ multipipetter

Plastspatler

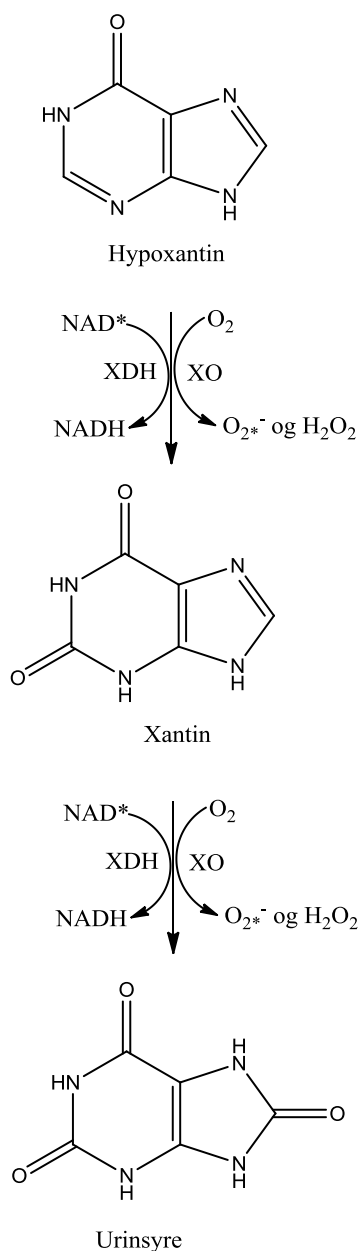
Prosedyre

1. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve som består av 0.95 ml A, 2.00 ml B og 0.05 ml DMSO i en kvartskyvette. Blandingene omrøres godt med en plastspatel og skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
2. Blank prøve (uten hemmer): Bland 0.90 ml A, 2.00 ml B og 0.05 ml DMSO i en kyvette (3 paralleller). Ved tid=0 tilsettes 0.05 ml C og blandingen omrøres godt med en plastspatel. Absorbansøkning ved 234 nm måles fra 30 til 90 sekunder etter tilsetning av C. Økning i absorbansen bør være mellom 0.3-0.5 AU/min. Dette punktet bør gjentas etter hver 3. måleserie med testløsninger for å kontrollere at enzymaktiviteten er stabil
3. Testløsning (med hemmer): Bland 0.90 ml A, 2.00 ml B og 0.05 ml D i en kyvette (3 paralleller). Ved tid=0 tilsettes 0.05 ml C og blandingen omrøres godt med en plastspatel. Absorbansøkning ved 234 nm måles fra 30 til 90 sekunder etter tilsetning av C
4. Quercetin blir brukt som positiv kontroll og skal testes som under punkt 3, men bytt ut D med quercetinløsning
5. Kast innholdet i kyvettene etter hver måling og skyll kyvettene med buffer A

5.2.4.3 Xantin oksidasehemming

Xantin oksidase (XO) og xantin dehydrogenase (XDH) er enzymformer som går over i hverandre, kjent som xantin oksidoreduktase (XOR). XDH syntetiseres i kroppen og kan bli omdannet til XO ved oksidasjon eller proteolyse. En av hovedrollene til XOR er å omdanne hypoxantin til xantin og videre til urinsyre. Økt mengde urinsyre i blodet kan føre til hyperurikemi, og dersom urinsyren felles ut i vev vil det forårsake urinsyregikt. I tillegg har XO evne til å produsere $O_2^{\cdot-}$ under degradering av hypoxantin og xantin. XO-avledet $O_2^{\cdot-}$ kan reagere raskt med NO og danne peroksynitritt. Dette kan videre føre til oksidativ skade på proteiner, lipider og DNA. XO har også en viktig rolle i ulike former av iskemi og andre typer vevs- og karskader, inflammatoriske sykdommer og kronisk hjertesvikt.

Allopurinol er et legemiddel som hemmer XO og dette reduserer urinsyrenivået i blod og urin. Legemidlet blir raskt oksidert av XO til den aktive metabolitten oxypurinol, som også er en hemmer av XO. Allopurinol blir benyttet ved behandling av hyperurikemi og urinsyregikt, og har vist lovende resultater i behandling av andre patologiske tilstander i dyreeksperimenter og i humane kliniske forsøk (småskala). En ulempe ved bruk av allopurinol er bivirkninger og det er derfor nødvendig å utvikle nye og effektive legemidler med færre bivirkninger (Pacher et al. 2006).



Figur 5.9: Degradering av hypoxantin og xantin til urinsyre (Pacher et al. 2006)

Prosent enzymhemming blir beregnet på samme måte som for 15-LOX hemming, med følgende formel:

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/dt) - (dA_2/dt)] / (dA_1/dt)$$

dA_1/dt : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

dA_2/dt : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

Reagenser

A: Natriumkaliumfosfatbuffer 0.05 M, pH= 7.5. Laget av kaliumdihydrogenfosfat og natriumhydrogenfosfat

B: Substratløsning. 10 mg hypoxantin løses i 500 ml destillert vann

C: Enzymløsning. XO løses i A til en konsentrasjon på ca. 1.8 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket

Testsubstans

Quercetin

DMSO

Destillert vann

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter

Plastspatel

Prosedyre

1. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve som består av 1.85 ml A, 0.05 ml DMSO, 1.0 ml destillert vann og 0.1 ml C. Blandingen omrøres godt med en plastspatel og skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
2. Blank prøve: Bland 1.85 ml A, 0.1 ml C og 0.05 ml DMSO i en kyvette (3 paralleller). Deretter skal 1.0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetting av B, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter. Dette punktet bør gjentas etter hver 3. måleserie med testløsninger for å kontrollere at enzymaktiviteten er stabil
3. Testløsning: Bland 1.85 ml A, 0.1 ml C og 0.05 ml prøveløsning i en kyvette (3 paralleller). Deretter skal 1.0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetting av B, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter
4. Quercetin blir brukt som positiv kontroll og skal testes på samme måte som under punkt 3, men bytt ut 0.05 ml prøveløsning med quercetin
5. Kast innholdet i kyvettene etter hver måling, og skyll kyvettene med destillert vann

5.3 Eksperimentell utførelse

5.3.1 Utgangsmateriale

Utgangsmaterialet (25.69 g) var et etanol (EtOH)-råekstrakt av *X.americana* blad som forelå ved Farmasøytisk institutt (FI). EtOH-råekstraktet ble framstilt av Cecilie Sogn (Diallo et al. 2002). Plantematerialet ble innsamlet i Siby en gang mellom juni 1998 og april 1999.

Plantematerialet ble identifisert og herbarieeksemplar av plantematerialet ble oppbevart ved ”The Department of Traditional Medicine” (DMT) i Mali.

5.3.1.1 NMR-spektroskopi

EtOH-råekstraktet ble analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR. CD_3OD tilsatt TMS som intern standard ble brukt som løsemiddel. Dette løsemidlet ble brukt senere i NMR-spektroskopi der intet annet er angitt.

5.3.1.2 Bioassay

Ved bestemmelse av biologisk aktivitet ble EtOH-råekstraktet testet for radikalscavenging (DPPH-test), 15-LOX hemming og XO hemming. Som løsemiddel ble det brukt DMSO.

5.3.2 Ekstraksjon av EtOH-råekstrakt

Flytskjema for ekstraksjonen av EtOH-råekstrakt er vist i vedleggsdelen (se flytskjema 1).

5.3.2.1 Væske-væske ekstraksjon

EtOH-råekstraktet (25.69 g) ble løst i 400 ml etylacetat og tilsatt 300 ml vann. Suspensjonen ble overført til en skilletrakt og ekstrahert med løsemidler av økende polaritet (se tabell 5.1).

Tabell 5.1: Løsemidler benyttet ved ekstraksjon av EtOH-råekstrakt

Løsemiddel	Mengde
Etylacetat (EtoAc)	4x 300 ml
1-Butanol (BuOH)	5x 300 ml

Under hver ekstraksjon ble skilletrakten ristet godt for å skille fasene fra hverandre. Den organiske fasen ble tappet av og filtrert over i forhåndsveide pærekolber. EtOAc-fasen ble filtrert med Whatman faseseparasjonspapir, mens BuOH-fasen var i stor mengde og ble

filtrert med Whatman nr.1 filterpapir. Fasene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Den vandige resten som var igjen etter siste ekstraksjon med 1-BuOH ble filtrert med Whatman faseseparasjonspapir og dampet inn til tørrhet på samme måte som de andre fasene.

5.3.2.2 NMR-spektroskopi

EtOAc-, BuOH- og vannekstraktet ble analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR. Som løsemiddel ble det brukt CD_3OD tilsatt TMS til EtOAc- og BuOH ekstraktet, mens tungtvann (D_2O) ble brukt til vannekstraktet.

5.3.2.3 Bioassay

DPPH-test, 15-LOX hemming og XO hemming ble utført for alle ekstrakter. DMSO ble brukt som løsemiddel i alle testene.

5.3.2.4 Analytisk HPLC

EtOH-råekstrakt, EtOAc-ekstrakt og BuOH-ekstrakt ble analysert med analytisk HPLC. En liten mengde av hvert ekstrakt ble løst i 50% vandig acetonitril. Prøveløsningene av ekstraktene hadde en konsentrasjon på 1 mg/ml og de ble filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter for å fjerne partikler. En Chromolith omvendt-fase C_{18} -kolonne (100x 4.6 mm) ble benyttet og deteksjonen ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm for å detektere interessante stoffer. For eksempel absorberer aromater UV-lys ved 280 nm og flavonoider ved 340 nm.

Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom acetonitril (ACN) og vann, og hvert enkelt løsemiddel var tilsatt 0.1 % trifluoreddiksyre (TFA). Analysen ble utført ved gradienteluering (se tabell 5.2).

Vannekstraktet ble ikke analysert i analytisk HPLC, fordi tidligere resultater fra NMR og bioassay viste at vannekstraktet var lite interessant.

Tabell 5.2: Gradientsystem for analytisk HPLC av EtOH-, EtOAc- og BuOH-ekstrakt

Tid (min)	% A (vann + 0.1% TFA)	% B (ACN+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	95	5	2
5	80	20	2
30	10	90	2
35	10	90	2
36	95	5	2
45	95	5	2

5.3.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstrakt

Flytskjema for fraksjonering av EtOAc-ekstrakt og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene er vist i vedleggsdelen (se flytskjema 2-12).

5.3.3.1 Versaflash kolonneseparasjon

EtOAc-ekstraktet (6,87 g) ble løst i 75 ml 67 % vandig MeOH og filtrert gjennom et S&S rundfilter. Bunnfallet fra filtreringen ble tatt vare på. Ved kolonneseparasjon ble det benyttet en omvendt-fase C₁₈-kolonne (80x 300 mm). Kolonnen ble vasket med 1 liter ren MeOH og kondisjonert med 1 liter 20 % vandig MeOH.

Som mobilfase ble det brukt MeOH eller ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble benyttet med økende mengde av MeOH (se tabell 5.3). Gjenværende stoff ble vasket ut med 90 % vandig aceton. Til slutt ble kolonnen vasket med 100 % MeOH.

Det ble samlet 60 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.3: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av EtOAc-ekstrakt

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (50:50)	1-14	700
MeOH:vann (70:30)	15-42	1400
MeOH (100%)	43-59	1300
Aceton:vann (90:10)	60	1000

5.3.3.2 DPPH spraying

For å undersøke hvilke fraksjoner som hadde radikalscavengeraktivitet ble de 60 kolonnefraksjonene av EtOAc-ekstraktet applisert på en omvendt-fase TLC-aluminiumsplate (RP-18F₂₅₄S). I tillegg ble bunnfallet av EtOAc-ekstraktet (se avsnitt 5.3.3.1 Versaflash kolonneseparasjon) løst i litt MeOH og applisert på samme TLC-plate. DPPH-reagens ble sprayet jevnt utover TLC-platen.

5.3.3.3 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene og bunnfallet ble analysert videre på TLC-aluminiumsplater (RP-18F₂₅₄S). Kolonnefraksjon 1-38 ble eluert med 65 % vandig MeOH og kolonnefraksjon 39-60 samt bunnfallet ble eluert med 100 % MeOH. Etter at TLC-platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort-og langbølget UV-lys og sprayet med ceric-reagens. Kolonnefraksjoner som inneholdt samme komponenter ble slått sammen. Dette ble vurdert utifra resultatet fra TLC-platen med DPPH-spraying og fra TLC-platene med ceric spraying.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 14 fraksjoner, og bunnfallet utgjorde fraksjon 15 (se tabell 5.4). Disse fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Fraksjonene ble kalt E1-E15.

Tabell 5.4: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc-ekstrakt

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-3	E1
4-8	E2
9-13	E3
14	E4
15-19	E5
20-25	E6
26-27	E7
28-30	E8
31-32	E9
33-36	E10
37-42	E11
43-48	E12
49-59	E13
60	E14
Bunnfall	E15

5.3.3.4 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av fraksjon E2-E13 og E15. ^{13}C NMR ble tatt for fraksjon E2-E10. CD_3OD tilsatt TMS ble brukt for fraksjon E2-E12. Deuterert aceton tilsatt TMS ble brukt for fraksjon 13 og deuterert kloroform tilsatt TMS ble brukt til bunnfallet.

5.3.3.5 Bioassay

DPPH-testen ble utført for fraksjon E1-E15 ved en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/ml}$. DMSO ble brukt som løsemiddel.

15-LOX hemming og XO hemming ble ikke utført fordi EtOH-råekstraktet viste lav aktivitet i disse testene.

5.3.3.6 Analytisk HPLC

For å avgjøre hvilke fraksjoner som kunne inneholde interessante stoffer ble fraksjon E1-E15 analysert ved hjelp av analytisk HPLC. En liten mengde av hver fraksjon ble løst i 50 % vandig MeOH og deretter filtrert gjennom HPLC solvent/sample filter for å fjerne partikler. Prøveløsningene ble injisert i en C_{18} -kolonne (100x 4.6 mm) og deteksjonen ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom ACN og vann. Det ble brukt gradienteluering (se tabell 5.5).

Tabell 5.5: Gradientsystem for analytisk HPLC av EtOAc-fraksjoner

Tid (min)	% A (vann+ 0.1% TFA)	% B (ACN+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	95	5	2
15	40	60	2
16	10	90	2
20	10	90	2
21	95	5	2
35	95	5	2

5.3.4 Separasjon av fraksjon E2

5.3.4.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon E2 var på 700 mg. Omtrent 151 mg av E2 ble tatt ut til lagring og de resterende 549 mg ble løst i 3 ml 10 % vandig MeOH. Prøveløsningen ble filtrert gjennom et Millex filter.

Det ble benyttet en C₁₈-kolonne (40x 150 mm) som ble kondisjonert med 180 ml 10 % vandig MeOH. Som mobilfase ble det brukt MeOH eller ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann (se tabell 5.6).

Det ble samlet 24 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.6: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E2

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (10:90)	1-3	70
MeOH:vann (20:80)	4-9	200
MeOH:vann (50:50)	10-15	200
MeOH (100%)	16-24	250

5.3.4.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18F₂₅₄S). TLC-platen med kolonnefraksjon 1-9 ble eluert med 30 % vandig MeOH, og TLC-platen med kolonnefraksjon 10-24 ble eluert med 65 % vandig MeOH. Etter at TLC-platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort-og langbølget UV-lys og deretter sprayet med DPPH-reagens.

Kolonnefraksjoner ble slått sammen utifra det som ble observert på TLC-platene.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til syv fraksjoner (se tabell 5.7) og disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene E2.1-E2.7.

Tabell 5.7: Sammenslåing av E2 fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	E2.1
3	E2.2
4	E2.3
5	E2.4
6-9	E2.5
10-12	E2.6

13-24	E2.7
-------	------

5.3.4.3 Analytisk HPLC

Små mengder av fraksjon E2.1-E2.7 ble løst i 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom HPLC solvent/sample filter for å fjerne partikler. Prøveløsningene ble injisert i en omvendt-fase C₁₈-kolonne. Deteksjonen ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm for å se hvilke fraksjoner som var rene og som kunne inneholde interessante stoffer. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom ACN og vann (se tabell 5.8).

Tabell 5.8: Gradientsystem for analytisk HPLC av fraksjonene (E2.1-E2.7) fra E2

Tid (min)	% A (vann+ 0.1% TFA)	% B (ACN+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	95	5	2
15	40	60	2
17	40	60	2
18	95	5	2
32	95	5	2

5.3.4.4 Bioassay

DPPH-testen ble utført for alle fraksjoner ved en konsentrasjon på 10 µg/ml. DMSO ble brukt som løsemiddel.

5.3.4.5 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H NMR av fraksjon E2.1-E2.7 og ¹³C NMR av fraksjon E2.1-E2.4.

5.3.5 Separasjon av fraksjon E2.1

5.3.5.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som kunne gi god separasjon av stoffer i preparativ HPLC. En liten mengde av E2.1 ble løst i 50 % vandig ACN og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter for å fjerne partikler. Det ble benyttet en Varian C₁₈-kolonne (250x 4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min). Deteksjonen ble fulgt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfasen bestod av forskjellig blandingsforhold mellom ACN og vann, der hvert løsemiddel var tilsatt 0.1 % TFA.

5.3.5.2 Preparativ HPLC

Fraksjon E2.1 (98.2 mg) ble løst i 4.5 ml 50 % vandig ACN og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Ca. 1 ml av prøveløsningen ble injisert på en C₁₈-kolonne (250x 21.4 mm). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm fordi interessante stoffer (for eksempel aromater) absorberte ved denne bølgelengden, og dette ble observert ved analytisk HPLC. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom ACN og vann, med 0.1 % TFA tilsatt i hvert løsemiddel. Det ble benyttet gradienteluering (se tabell 5.9). Totalt ble injeksjon av prøve foretatt fire ganger fordi ved hver injeksjon skulle konsentrasjonen av prøven være rundt 20-30 mg/ml. Fraksjoner ble samlet opp for hver høy absorbanstopp som ble detektert.

Tabell 5.9: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon E2.1

Tid (min)	% A (vann+ 0.1% TFA)	% B (ACN+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	97	3	20
5	97	3	20
10	95	5	20
12	60	40	20
14	60	40	20
15	97	3	20
25	97	3	20

5.3.5.3 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. Fraksjonene ble slått sammen basert på kromatogrammene fra analytisk HPLC. En liten mengde av hver fraksjon ble injisert på C₁₈-kolonnen (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjon ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen var den samme som for preparativ HPLC (se tabell 5.9).

Det ble slått sammen til fem fraksjoner og disse ble kalt E2.1.1-E2.1.5. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.5.4 NMR-spektroskopi

Fraksjon E2.1.1-E2.1.5 ble analysert ved hjelp av ¹H-og ¹³C NMR. I tillegg ble det tatt HMQC av fraksjon E2.1.1.

5.3.5.5 Bioassay

DPPH-testen, 15-LOX hemming og XO hemming ble utført på fraksjon E2.1.1, E2.1.2 og E2.1.3. I DPPH-testen ble MeOH brukt som løsemiddel, mens i 15-LOX hemming og XO hemming ble DMSO brukt som løsemiddel.

5.3.6 Separasjon av fraksjon E2.3

5.3.6.1 Analytisk HPLC

For å finne ut hvilken mobilfase som kunne gi god separasjon av stoffer, ble en liten mengde av fraksjon E2.3 analysert på analytisk HPLC. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.5.1 Analytisk HPLC).

5.3.6.2 Preparativ HPLC

Fraksjon E2.3 (59 mg) ble løst i 3 ml 50 % vandig ACN og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Prøveløsningen ble injisert på en C₁₈-kolonne (250x 21.4 mm) og deteksjonen ble foretatt ved 280 nm. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom ACN og vann. Gradienteluering ble benyttet (se tabell 5.10). Fraksjoner ble samlet opp for hver stor absorbanstopp som ble detektert. Absorbanstoppene som dukket opp i kromatogrammet var ulike de fra analytisk HPLC. En mulig grunn var at stoffene i fraksjonen var dekomponerte.

Tabell 5.10: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon E2.3

Tid (min)	% A (vann+0.1% TFA)	% B (ACN+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	95	5	20
15	60	40	20
20	60	40	20
21	95	5	20
30	95	5	20

5.3.6.3 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble brukt for å sjekke om stoffene i fraksjon E2.3 var virkelig dekomponerte. Fraksjonene ble injisert på C₁₈-kolonnen (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjon ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen var den samme som for preparativ HPLC (se tabell 5.10).

Det var fire fraksjoner som så interessante ut i analytisk HPLC og de ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Fraksjonene ble kalt E2.3.1-E2.3.4.

5.3.6.4 NMR-spektroskopi

Fraksjon E2.3.1-E2.3.4 ble analysert ved hjelp av ^1H NMR. Det ble også tatt ^{13}C NMR av fraksjon E2.3.1 og E2.3.4.

5.3.7 Separasjon av fraksjon E2.4

5.3.7.1 Analytisk HPLC

For å finne en god mobilfase som kunne gi god separasjon av stoffer, ble en liten mengde av fraksjon E2.4 analysert på analytisk HPLC. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.5.1 Analytisk HPLC).

5.3.7.2 Preparativ HPLC

Fraksjon E2.4 (26.6 mg) ble løst i 1.5 ml 50% vandig ACN og deretter filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter for å fjerne partikler. Prøveløsningen ble injisert på en C_{18} -kolonne (250x 21.4 mm) og deteksjonen ble foretatt ved 280 nm. Det ble brukt samme mobilfase sammensetning som for fraksjon E2.3 (se tabell 5.10). Fraksjoner ble samlet opp for hver stor absorbanstopp som ble detektert.

5.3.7.3 Analytisk HPLC

Fraksjonene fra preparativ HPLC ble injisert på en C_{18} -kolonne (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjon ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen var den samme som for preparativ HPLC (se tabell 5.10).

Det var to fraksjoner som var interessante og disse ble kalt E2.4.1 og E2.4.2. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.7.4 NMR-spektroskopi

Begge fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H -og ^{13}C NMR

5.3.7.5 Bioassay

DPPH-testen ble utført på fraksjon E2.4.2. MeOH ble valgt som løsemiddel.

5.3.8 Separasjon av fraksjon E6

5.3.8.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon E6 (915 mg) ble løst i 10 ml 70 % vandig MeOH og satt på ultralydbad i 1 minutt. Dette gjorde at fraksjonen ble fullstendig oppløst. C₁₈-kolonnen (40x 150 mm) ble kondisjonert med 180 ml 50% MeOH. Som mobilfase ble det brukt gradienteluering med økende mengde MeOH (se tabell 5.11).

Det ble samlet 31 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.11: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E6

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:destillert vann (50:50)	1-13	200
MeOH:destillert vann (70:30)	14-22	150
MeOH (100 %)	23-31	150

5.3.8.2 Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F₂₅₄S) og eluert med 50 % vandig MeOH. Etter at TLC-platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort-og langbølget UV-lys og sprayet med ceric-reagens. Kolonnefraksjoner som inneholdt samme komponenter ble slått sammen på bakgrunn av TLC-platene (se tabell 5.12).

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til seks fraksjoner og disse ble kalt E6.1-E6.6.

Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

Tabell 5.12: Sammenslåing av E6 fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-3	E6.1
4-5	E6.2
6-9	E6.3
10-16	E6.4
17-19	E6.5
20-31	E6.6

5.3.8.3 Bioassay

DPPH-testen ble utført for alle fraksjoner ved en konsentrasjon på 10 µg/ml. Som løsemiddel ble det brukt MeOH.

5.3.8.4 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -og ^{13}C NMR på fraksjon E6.2, E6.3 og E6.4.

5.3.9 Separasjon av fraksjon E6.2-3

5.3.9.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

En Sephadex LH-20 kolonne (25x 2.5 cm) ble kondisjonert med 20 % vandig MeOH.

Fraksjon E6.2-3 (734.4 mg) ble løst i 20 % vandig MeOH og applisert på kolonnen. Som mobilfase ble det brukt MeOH og ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann.

Gradienteluering ble benyttet med økende mengde MeOH (se tabell 5.13).

Det ble samlet opp 21 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.13: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E6.2-3

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (35:70)	0	50
MeOH:vann (50:50)	1-2	100
MeOH:vann (70:30)	3-8	175
MeOH (100%)	9-20	350

5.3.9.2 Analytisk TLC

Alle kolonnefraksjoner ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F₂₅₄S). Platene ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.8.2 Analytisk TLC), men TLC-platene ble ikke sprayet med ceric-reagens.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til fem fraksjoner og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Disse ga fraksjon S1-S5 (se tabell 5.14).

Tabell 5.14: Sammenslåing av E6.2-3 fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
0-5	S1

6-8	S2
9-13	S3
14-17	S4
18-20	S5

5.3.9.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -og ^{13}C NMR av alle fraksjoner, unntatt fraksjon S4 hvor det ble kun tatt ^1H NMR.

5.3.9.4 Bioassay

DPPH-testen ble utført på fraksjon S1. MeOH ble brukt som løsemiddel. Fraksjonen ble også testet for 15-LOX hemming og XO hemming hvor DMSO ble brukt som løsemiddel.

5.3.10 Separasjon av fraksjon S3

5.3.10.1 Sephadex LH-20 kolonne separasjon

Sephadex LH-20 kolonnen (25x 2.5 cm) ble kondisjonert med 60 % vandig MeOH. Fraksjon S3 (463.4 mg) ble løst i 4.5 ml 60 % vandig MeOH og applisert på kolonnen. Som mobilfase ble det brukt MeOH og ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble benyttet med økende mengde MeOH (se tabell 5.15).

Det ble samlet opp 23 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.15: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av S3

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:destillert vann (60:40)	1-4	120
MeOH:destillert vann (70:30)	5-8	80
MeOH:destillert vann (80:20)	9-18	220
MeOH (100%)	19-23	150

5.3.10.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-aluminiumsplater (RP-18F₂₅₄S) og utviklet med 70 % vandig MeOH. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.8.2 Analytisk TLC), men TLC-platene ble ikke sprayet med ceric-reagens.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til fem fraksjoner og disse utgjorde fraksjon S3.1-S3.5 (se tabell 5.16). Disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

Tabell 5.16: Sammenslåing av S3 fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-8	S3.1
9-11	S3.2
12-14	S3.3
15-17	S3.4
18-23	S3.5

5.3.10.3 NMR-spektroskopi

Fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR. Fraksjon S3.4 ble også analysert ved ^{13}C NMR.

5.3.11 Separasjon av fraksjon S3.3

5.3.11.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon S3.3 (330.9 mg) ble løst i 4 ml 50 % vandig MeOH, men løste seg dårlig. 100 % MeOH ble tilsatt for å løse opp resten av prøven og løsningen ble deretter filtrert gjennom et Millex filter. C_{18} -kolonnen (40x 150 mm) ble kondisjonert med 180 ml 50% MeOH. Som mobilfase ble det brukt gradienteluering med økende mengde MeOH (se tabell 5.17).

Det ble samlet opp 38 kolonnefraksjoner.

Tabell 5.17: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av S3.3

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (50:50)	1-7	150
MeOH:vann (70:30)	8-23	300
MeOH (100 %)	24-38	300

5.3.11.2 Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble applisert på TLC-aluminiumsplater (RP-18 F) og eluert med 65 % MeOH. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.8.2 Analytisk TLC).

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til seks fraksjoner. Dette ga fraksjon S3.3.1-S3.3.6 (se tabell 5.18).

Tabell 5.18: Sammenslåing av S3.3 fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2	S3.3.1
3-5	S3.3.2
6-9	S3.3.3
10-20	S3.3.4
21-30	S3.3.5
31-38	S3.3.6

5.3.11.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjoner.

5.3.12 Separasjon av fraksjon S3.3.2

5.3.12.1 Analytisk HPLC

For å bestemme hvilken mobilfase som kunne gi god separasjon av stoffer, ble fraksjon S3.3.2 analysert ved analytisk HPLC. En liten mengde av fraksjon S3.3.2 ble løst i 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble benyttet en C_{18} -kolonne (250x 4.6 mm, flowrate 1 ml/min). Deteksjonen ble foretatt ved 264 nm, 280 nm og 340 nm. Det ble brukt mobilfase med ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann.

5.3.12.2 Preparativ HPLC

Av fraksjon S3.3.2 (73.2 mg) ble ca. 27 mg løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH. Prøveløsningen ble filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter og deretter injisert på en C_{18} -kolonne (250x 21.4 mm). Deteksjon ble foretatt ved 264 nm. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann, og det ble benyttet gradienteluering (se tabell 5.19). Fraksjoner ble samlet opp for hver stor absorpsjonstopp som ble detektert.

Tabell 5.19: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon S3.3.2

Tid (min)	% A (vann+ 0.1% TFA)	% B (MeOH+ 0.1% TFA)	Flowrate (ml/min)
0	60	40	20
5	50	50	20
25	40	60	20
26	60	40	20
30	60	40	20

5.3.12.3 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. En liten mengde av hver fraksjon ble injisert på omvendt-fase kolonnen (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjon ble foretatt ved 264 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen er den samme som for preparativ HPLC (se tabell 5.19).

Det var fire fraksjoner som var interessante og de ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Fraksjonene ble kalt S3.3.2.1- S3.3.2.4.

5.3.12.4 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjoner. Det ble også tatt ^{13}C NMR av fraksjon S3.3.2.2.

5.3.12.5 Bioassay

Fraksjon 3.3.2.2 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test), 15-LOX hemming og XO hemming. MeOH ble brukt som løsemiddel i DPPH-testen, mens DMSO ble brukt som løsemiddel i 15-LOX hemming og XO hemming.

5.3.13 Separasjon av fraksjon S3.3.2.3

5.3.13.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.3.2.3 (7.9 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.12.2 Preparativ HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 340 nm.

5.3.13.2 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.12.3 Analytisk HPLC).

Det ble i alt tre fraksjoner og disse ble kalt S3.3.2.3.1, S3.3.2.3.2 og S3.3.2.3.3. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.13.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjonene og ^{13}C NMR av fraksjon S3.3.2.3.2.

5.3.14 Separasjon av fraksjon S3.3.2.4

5.3.14.1 Preparativt HPLC

Fraksjon S3.3.2.4 (10.2 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.12.2 Preparativ HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 340 nm.

5.3.14.2 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for å avgjøre hvilke fraksjoner som kunne inneholde interessante stoffer. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.12.3 Analytisk HPLC).

Det var to fraksjoner som var interessante og disse ble kalt fraksjon S3.3.2.4.1 og S3.3.2.4.2. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.14.3 NMR-spektroskopi

Begge fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H -og ^{13}C NMR. I tillegg ble det tatt COSY og HSQC av fraksjon S3.3.2.4.1.

5.3.14.4 Bioassay

DPPH-testen, 15-LOX hemming og XO hemming ble utført på fraksjon S3.3.2.4.1. MeOH ble brukt som løsemiddel i DPPH-testen, mens DMSO ble brukt som løsemiddel ved 15-LOX hemming og XO hemming.

5.3.15 Separasjon av fraksjon S3.4

5.3.15.1 Analytisk HPLC

For å finne ut hvilken mobilfase som kunne gi god separasjon av stoffer, ble fraksjon S3.4 analysert på analytisk HPLC. En liten mengde av S3.4 ble løst i 50 % vandig ACN og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble benyttet en C₁₈-kolonne (250x 4.6 mm). Deteksjonen ble fulgt ved 230 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfasen bestod av forskjellig blandingsforhold mellom ACN og vann, hvor hvert løsemiddel ble tilsatt 0.1 % TFA.

5.3.15.2 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4 (68.8 mg) ble løst i 3 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Ca. 1.5 ml av prøveløsningen ble injisert på en C₁₈-kolonne (250x 21.4 mm). Deteksjonen ble foretatt ved 264 nm. Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold mellom ACN og vann, og det ble benyttet gradienteluering. Sammensetning av mobilfase anvendt var lik sammensetningen for fraksjon E2.3 (se avsnitt 5.3.6.2 Preparativ HPLC). Injeksjon av prøve ble utført 2 ganger fordi ved hver injeksjon skulle konsentrasjonen være omtrent 20-30 mg/ml. Fraksjoner ble samlet opp for hver stor absorpsjonstopp som ble detektert.

5.3.15.3 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. En liten mengde av hver fraksjon ble injisert på C₁₈-kolonnen (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjonen ble foretatt ved 264 nm, 280 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen var den samme som for preparativ HPLC.

Det var ti fraksjoner som hadde interessante kromatogrammer, og disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Fraksjonene ble kalt S3.4.1-S3.4.10.

5.3.15.4 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av ¹H NMR. Det ble også tatt ¹³C NMR av fraksjon S3.4.1, S3.4.4 og S3.4.7.

5.3.15.5 Bioassay

DPPH-test, 15-LOX hemming og XO hemming ble utført på fraksjon S3.4.1 og S3.4.4.

MeOH ble brukt som løsemiddel i DPPH-testen og DMSO ble brukt ved 15-LOX hemming og XO hemming.

5.3.16 Separasjon av fraksjon 3.4.3

5.3.16.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3 (12.3 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.2 Preparativ HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 264 nm.

5.3.16.2 Analytisk HPLC

En liten mengde av hver fraksjon ble analysert ved analytisk HPLC. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.3 Analytisk HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 264 nm og 340 nm.

Det var kun én fraksjon som hadde et interessant kromatogram. Fraksjonen ble kalt S3.4.3.1 og ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.16.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av fraksjon S3.4.3.1.

5.3.17 Separasjon av fraksjon S3.4.3.1

5.3.17.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3.1 (10.5 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.2 Preparativ HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm istedenfor 264 nm fordi det var problemer med å få endret på bølgelengden på maskinen.

5.3.17.2 Analytisk HPLC

Kolonnefraksjonene ble analysert med analytisk HPLC. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.3 Analytisk HPLC).

Det var to fraksjoner som var interessante. Disse ble kalt S3.4.3.1.1 og S3.4.3.1.2, og ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.17.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av begge fraksjonene. Det ble også tatt ^{13}C NMR av fraksjon S3.4.3.1.2.

5.3.18 Separasjon av fraksjon S3.4.3.1.1

5.3.18.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3.1.1 (6.4 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.2 Preparativ HPLC).

5.3.18.2 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. Det ble brukt en C_{18} -kolonne (250x4.6 mm, flowhastighet på 1 ml/min) og deteksjonen ble foretatt ved 264 nm og 340 nm. Mobilfase sammensetningen var den samme som for preparativ HPLC.

Det var to fraksjoner som virket interessante. Fraksjonene ble kalt S3.4.3.1.1.1 og S3.4.3.1.1.2, og ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.18.3 NMR-spektroskopi

Fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR.

5.3.19 Separasjon av fraksjon S3.4.3.1.1.1

5.3.19.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3.1.1.1 (2.7 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.2 Preparativ HPLC).

5.3.19.2 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.3 Analytisk HPLC).

Det ble var kun én fraksjon som hadde et interessant kromatogram og fraksjonen ble kalt S3.4.3.1.1.1.1. Fraksjonen ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.19.3 NMR-spektroskopi

Fraksjon S3.4.3.1.1.1.1 ble analysert ved hjelp av ^1H NMR.

5.3.19.4 Bioassay

Fraksjon S3.4.3.1.1.1.1 ble slått sammen med fraksjon S3.4.3.1.2 og S3.4.3.1.1.2. Disse ble testet for radikalscavenging aktivitet. MeOH ble brukt som løsemiddel.

5.3.20 Separasjon av fraksjon S3.4.9

5.3.20.1 Preparativ HPLC

En liten mengde av fraksjon S3.4.9 (22.1 mg) ble løst i 1.5 ml 50 % vandig MeOH og filtrert gjennom et HPLC solvent/sample filter. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.2 Preparativ HPLC).

5.3.20.2 Analytisk HPLC

Fraksjoner fra preparativ HPLC ble analysert videre med analytisk HPLC. Det ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.3.15.3 Analytisk HPLC). Deteksjonen ble foretatt ved 264 nm, 280 nm og 340 nm.

Det var tre fraksjoner som var interessante. Disse ble kalt fraksjon S3.4.9.1-S3.4.9.3, og ble dampet inn til tørrhet på rotavapor.

5.3.20.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av ^1H NMR. ^{13}C NMR ble tatt for fraksjon S3.4.9.1 og S3.4.9.3.

5.3.20.4 Bioassay

DPPH-testen, 15-LOX hemming og XO hemming ble utført på fraksjon S3.4.9.3. I DPPH-testen ble MeOH brukt som løsemiddel, mens i 15-LOX hemming og XO hemming ble DMSO brukt som løsemiddel.

6 Resultater og diskusjon

6.1 EtOH-råekstrakt

6.1.1 NMR-spektroskopi

^1H NMR-spektret av EtOH-råekstraktet (se vedlegg, NMR-spekter 1) hadde en rekke signaler ved 0.80-2.40 ppm. Alifatiske protoner gir vanligvis signaler i dette området. Signaler ved 2.80-4.50 ppm var antatt å være protoner på oksygenert karbon (for eksempel karbohydrater). Ved 5.30-8.00 ppm var det signaler for olefiniske og aromatiske protoner. Signalene ved 3.31 ppm og 4.89 ppm tilhørte MeOH og vann.

^{13}C NMR-spektret (se vedlegg, NMR-spekter 2) viste signaler ved 12-42 ppm som er typisk for alifatiske karboner. I området 51-110 ppm var det mange nærliggende signaler som tydet på karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer. I tillegg hadde spektret signaler i olefin-, aromat-, og karbonylområdet ved 110-172 ppm. MeOH hadde signal ved 49 ppm. Tolkningen av spektret stemte godt overens med det som ble funnet i ^1H NMR-spektret.

6.1.2 Bioassay

DPPH-test

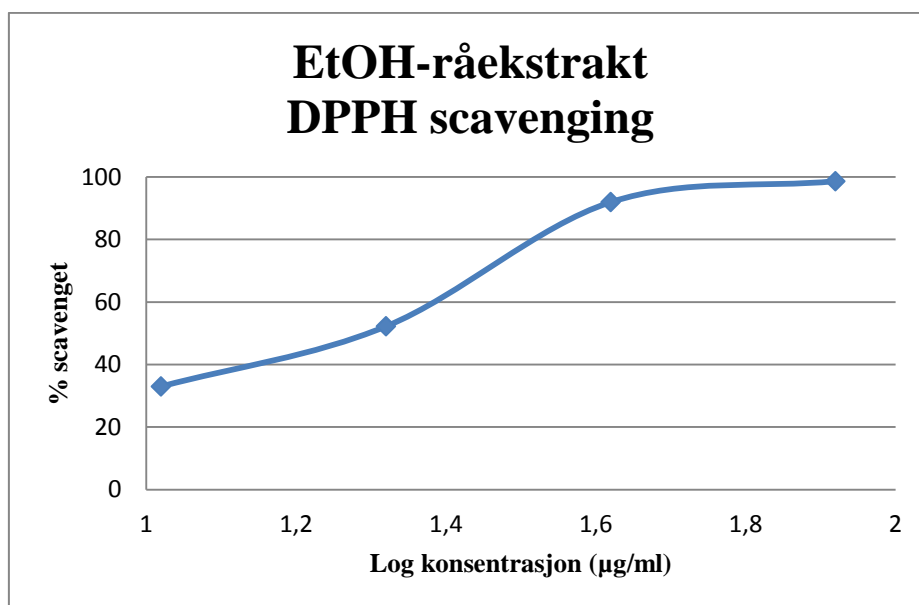
EtOH-råekstraktet ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.1). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($\text{IC}_{50} = 3.6 \pm 0.15 \text{ } \mu\text{g/ml}$ eller $11.8 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{M}$).

Tabell 6.1: DPPH-test av EtOH-råekstrakt

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
5	83.3	98.6	2.2	19.2 ± 0.8
2.5	41.7	91.9	3.3	
1.25	20.8	52.2	1.0	
0.625	10.4	33.0	2.0	

EtOH-råekstraktet hadde god radikalscavenger aktivitet med en IC_{50} -verdi på $19.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Allikevel var råekstraktet en svakere radikalscavenger enn quercetin. Aktiviteten til råekstraktet er doseavhengig (se figur 6.1).



Figur 6.1: Radikalscavenger aktivitet av EtOH-råekstrakt

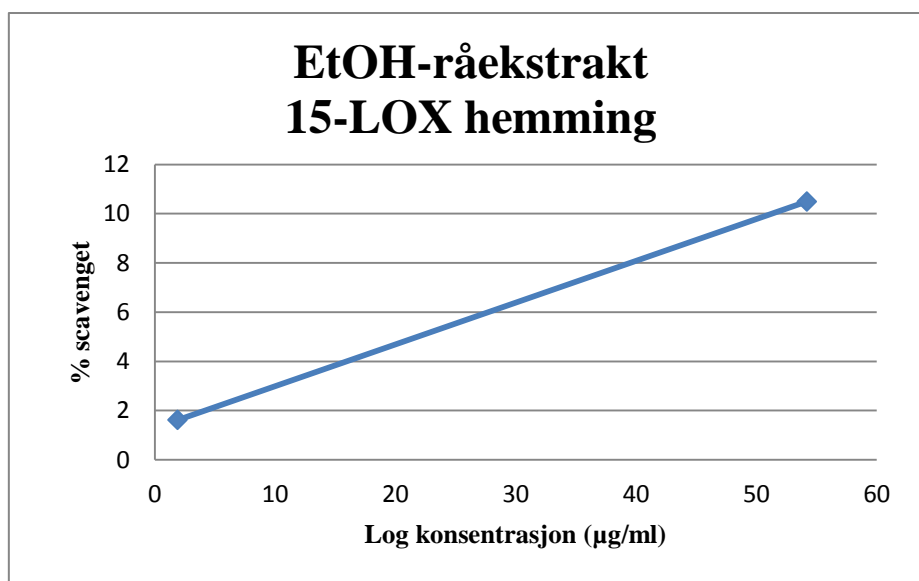
15-LOX hemming

Bestemmelse av 15-LOX hemming ble utført for EtOH-råekstraktet (se tabell 6.2). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ eller $56.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$).

Tabell 6.2: 15-LOX hemming av EtOH-råekstrakt

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} (µg/ml)
5	83.3	52.4	4.1	80.2 ± 5.5
2.5	41.7	10.5	4.2	

EtOH-råekstraktet ga en konsentrasjonsavhengig hemming av 15-LOX (se figur 6.2). IC_{50} -verdien var på 80.2 µg/ml. Ved denne konsentrasjonen ville råekstraktet gi 50 % hemming av 15-LOX. Hemmingsaktiviteten var lavere enn for quercetin.



Figur 6.2: 15-LOX hemming av EtOH-råekstrakt

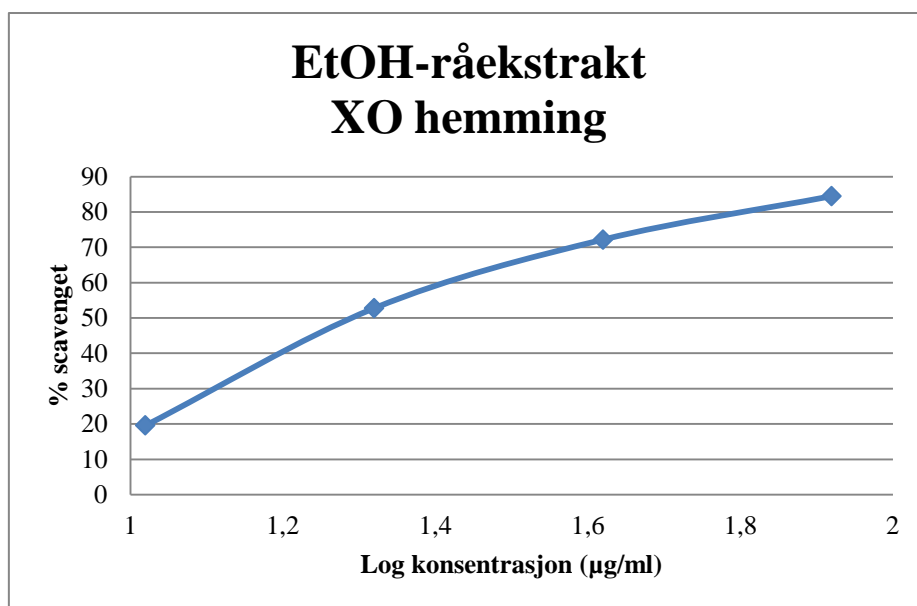
XO hemming

EtOH-råekstraktet ble testet for XO hemming (se tabell 6.3). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ eller $3.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$).

Tabell 6.3: XO hemming av EtOH-råekstrakt

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} (µg/ml)
5	83.3	84.5	2.9	19.6 ± 2.0
2.5	41.7	72.2	3.3	
1.25	20.8	52.8	4.5	
0.625	10.4	19.6	9.2	
0.3125	5.2	-6.1	15.1	

EtOH-råekstraktet viste seg å være en svak XO hemmer sammenliknet med quercetin. IC_{50} -verdien for råekstraktet var 19.6 µg/ml. Hemmingen er konsentrasjonsavhengig (se figur 6.3).



Figur 6.3: XO hemming av EtOH-råekstrakt

6.2 Ekstraksjon av EtOH-råekstraktet

6.2.1 Væske-væske ekstraksjon

EtOH-råekstraktet (25.69 g) ble grovseparert ved væske-væske ekstraksjon. Det ble brukt løsemidler av ulik polaritet: Etylacetat (EtOAc) er middels polart, butanol (BuOH) er mer polart og vann er det mest polare løsemidlet. De mest upolare stoffene eller stoffer som har mellomliggende polaritet ble ekstrahert over i EtOAc-fasen, mens mer polare stoffer ble ekstrahert over i BuOH-fasen. De mest polare stoffene ble værende i vannfasen.

EtOAc-fasen utgjorde den største fraksjonen med 42.5 % av råekstraktet (se tabell 6.4). Totalt utbytte av alle tre fasene var 80.4 %. De resterende 19.6 % var gått tapt. Tapet kunne skyldes at stoff/bunnfall ble holdt igjen på filterpapiret ved filtrering av de ulike fasene.

Tabell 6.4: Utbytte av ekstrakter fra EtOH-råekstrakt

Type ekstrakt	Vekt av ekstrakt (g)	Utbytte av ekstrakt (%)
EtOAc	10.91	42.5
BuOH	9.12	35.5
Vann	0.63	2.5
Totalt	20.66	80.4

6.2.2 NMR-spektroskopi

EtOAc-ekstraktet

^1H NMR-spektret for EtOAc-ekstraktet (se vedlegg, NMR-spekter 3) bestod av signaler ved 0.80-2.40 ppm som tydet på alifatiske protoner. Signaler ved 2.50-4.50 viste protoner på oksygenert karbon, og signaler ved 5.20-8.10 ppm viste olefiniske-og aromatiske protoner. Signaler ved 1.26 ppm, 1.99 ppm og 4.10 ppm stammet fra løsemidlet EtOAc. Signaler for MeOH lå ved 3.31 ppm og for vann ved 4.85 ppm.

^{13}C NMR-spektret (se vedlegg, NMR-spekter 4) så ut til å inneholde signaler for alifatiske karboner (15-35 ppm), og karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer (52-110 ppm). I tillegg var det signaler i olefin-og aromatområdet (110-180 ppm). Signaler ved 49 ppm skyldtes MeOH.

BuOH-ekstraktet

^1H NMR-spektret for BuOH-fasen (se vedlegg, NMR-spekter 5) inneholdt færre signaler enn for EtOAc-fasen. Det var mest signaler av alifatiske protoner (0.8-2.4 ppm) og protoner på oksygenert karbon (2.5-4.5 ppm). Få signaler ble observert ved olefin-og aromatområdet. Signalene ved 3.31 ppm og 4.88 ppm var fra MeOH og vann. Det samme ble observert i ^{13}C NMR-spektret (se vedlegg, NMR-spekter 6). Her var det signaler av alifatiske karboner og andre oksygenerte karbonatomer, men få signaler i aromat-og olefinområdet. Signalet ved 49 ppm kom fra MeOH.

Vannekstraktet

^1H NMR-spektret for vannfasen (se vedlegg, NMR-spekter 7) viste kun signaler av alifatiske protoner (2-2.5 ppm) og protoner på oksygenert karbon (3-4.2 ppm). Signaler ved 3.33 ppm og 4.79 ppm skyldtes MeOH og vann. I ^{13}C NMR-spektret (se vedlegg, NMR-spekter 8) var det et signal ved 173 ppm, dette kunne tyde på karbonyl. Ellers var det få aromatiske-og olefiniske signaler. Spektret bestod mest av karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer, og det var noen få signaler av alifatiske karbonatomer.

6.2.3 Bioassay

DPPH-test

Det ble utført DPPH-test på EtOAc-, BuOH- og vannekstraktet (se tabell 6.5). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.14 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ eller $10.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$).

Tabell 6.5: DPPH-test av EtOAc-, BuOH- og vannekstrakt

Ekstrakt	Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EtOAc	2.5	41.7	94.8	0.2	10.8 ± 0.3
	1.25	20.8	82.4	1.9	
	0.625	10.4	48.1	1.4	
	0.3125	5.2	22.7	0.8	
BuOH	2.5	41.7	74.3	1.6	20.5 ± 0.6
	1.25	20.8	50.5	1.0	
	0.625	10.4	28.3	1.8	
Vann	10	166.7	41.1	5.0	> 167
	5	83.3	23.8	0.6	
	2.5	41.7	12.3	0.8	

IC_{50} -verdiene i tabellen viste at EtOAc-ekstraktet hadde høyest grad av radikalscavenger aktivitet. EtOAc-ekstraktet hadde også høyere radikalscavenger aktivitet enn EtOH-råekstraktet. En konsentrasjon på $10.8 \mu\text{g/ml}$ av EtOAc-ekstraktet var nok til å redusere radikalaktiviteten med 50%. Siden EtOAc er et middels polart løsemiddel, kunne det tyde på at stoffer som bidro til radikalscavenger aktiviteten var upolare eller middels polare. Vannekstraktet var det mest polare ekstraktet og hadde svært lav scavenger aktivitet selv ved høyeste målte konsentrasjon.

15-LOX hemming

15-LOX hemming ble testet på alle ekstraktene (se tabell 6.6). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ eller $56.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$).

Tabell 6.6: 15-LOX hemming av EtOAc-, BuOH- og vannekstrakt

Ekstrakt	Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
EtOAc	5	83.3	69.5	0.9	32.4± 0.5
	2.5	41.7	17.7	1.4	
BuOH	10	166.6	87.7	2.5	102.7± 6.7
	5	83.3	33.9	6.1	
	2.5	41.7	9.7	6.7	
Vann	10	166.6	14.1	6	>167

Tallene i tabellen viste at EtOAc-ekstraktet hadde høyest grad av aktivitet ved hemming av 15-LOX. Ekstraktet hadde også høyere aktivitet enn EtOH-råekstraktet. Resultatene i denne testen viste samme trend som i DPPH-testen, hvor det mest upolare ekstraktet hadde høyest hemmingsaktivitet.

XO hemming

Ekstraktene ble også testet for XO hemming (se tabell 6.7). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀= 1.1± 0.2 µg/ml eller 3.8± 0.7 µM).

Tabell 6.7: XO hemming av EtOAc-, BuOH- og vannekstrakt

Ekstrakt	Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
EtOAc	1.25	20.8	65.1	3.2	16.1± 1.2
	0.625	10.4	24.2	6.5	
	0.3125	5.2	6	8.9	
BuOH	5	83.3	47.3	3.1	> 83
	0.625	10.4	1.9	5.6	
Vann	10	166.7	24.5	13.8	>167

Verdiene i tabell 6.7 viste at EtOAc-ekstraktet hadde høyest grad av aktivitet sammenlignet med BuOH-og vannekstraktet. EtOAc-ekstraktet hadde også høyere hemmingsaktivitet enn EtOH-råekstraktet. Vannekstraktet var tilnærmet inaktivt. BuOH-ekstraktet ble testet igjen etter ett år for å finne IC₅₀-verdien ved bruk av høyere konsentrasjon. Det ble oppdaget at oppbevaring av BuOH-ekstraktet har ført til nedgang i XO-hemmingen. For ett år siden lå hemmingsaktiviteten for 5 mg/ml på 47.3%, men ett år senere ble hemmingen redusert til 9.5%.

6.2.4 Analytisk HPLC

Vi var interessert i forbindelser med UV-absorbans ved 280 nm og 340 nm. Aromater absorberer UV-lys ved 280 nm, mens kumariner og flavonoider absorberer ved 340 nm. Det ble også detektert stoffer ved 230 nm. Forbindelser med absorbans ved 230 nm trengte ikke å være interessante for oss, men dersom ingenting ble funnet ved 280 nm eller 340 nm så kunne det være greit å se på responsen ved 230 nm. Kromatogrammer i analytisk HPLC viste at EtOH-råekstraktet og EtOAc-ekstraktet hadde flere signaler/topper ved 280 nm og 340 nm i forhold til BuOH-ekstraktet. I kromatogrammene til EtOH-råekstraktet og EtOAc-ekstraktet ble det observert topper som lå nære hverandre, noe som tydet på at ekstraktene inneholdt flere stoffer som hadde noenlunde samme hydrofilisitet/lipofilisitet. Disse stoffene hadde omtrent samme retensjonstider og det var ønskelig å kunne separere toppene fra hverandre (på den måten kunne man separere stoffer fra hverandre i et ekstrakt).

6.2.5 Videre arbeid

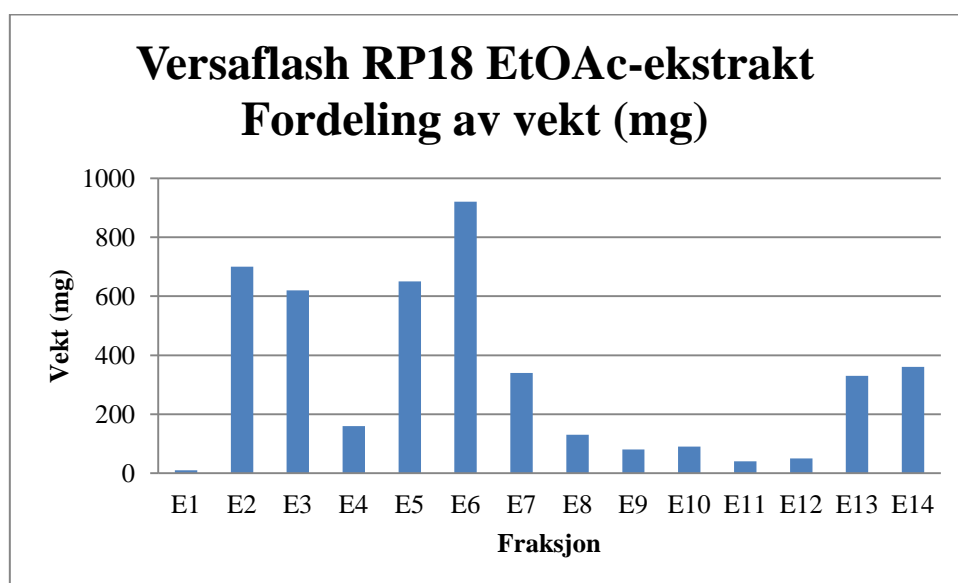
Resultatene fra NMR-spektroskopi, bioassay (DPPH-test, 15-LOX hemming og XO hemming) og analytisk HPLC ga en indikasjon om hvilken fraksjon som kunne være aktuell å gå videre med. ^1H -og ^{13}C NMR-spektrene viste at EtOAc-ekstraktet inneholdt olefiner og aromater. Det var færre av disse signalene i BuOH-og vannekestraktet. EtOAc-ekstraktet hadde også høyere radikalscavenger aktivitet. I analytisk HPLC var kromatogrammene av EtOAc-ekstraktet mest interessante. Kromatogrammene viste at EtOAc-ekstraktet inneholdt flere stoffer som absorberte ved 280 nm og 340 nm. På grunnlag av disse resultatene ble det fokusert på videre opprensing av EtOAc-ekstraktet.

6.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstrakt

6.3.1 Versaflash kolonne-separasjon

Ved fraksjonering av EtOAc-ekstraktet ble det benyttet en omvendt-fase C_{18} -kolonne. Mobilfasen bestod av MeOH eller en blanding av MeOH og vann. De mest polare stoffene ble eluert ut først, deretter kom de mindre polare stoffene på grunn av økende mengde organisk løsemiddel. På slutten ble kolonnen vasket med 90 % vandig aceton for å få ut upolare stoffer og alle andre stoffer som ikke kom ut med 100 % MeOH.

Det ble applisert 6.87 g EtOAc-ekstrakt på kolonnen, og 60 kolonnefraksjoner ble samlet opp. På bakgrunn av DPPH-spraying og analytisk TLC etterfulgt av ceric-spraying, ble disse fraksjonene slått sammen til fraksjon E1-E14. Det samlede utbyttet var 4.48 g (65 %). Tap av stoff kunne skyldes at noe stoff ble sittende i kolonnen eller at pumpen til Versaflash ikke klarte å suge opp all prøveløsning fra beholderen. Fraksjon E2, E3, E5 og E6 var de største fraksjonene (se figur 6.4). Fraksjon E2 og E3 ble eluert med 50% vandig MeOH og fraksjon E5 og E6 ble eluert med 70% vandig MeOH. Siden fraksjon E2 og E3 kom ut først av kolonnen, inneholdt fraksjonene stoffer som er mer polare enn de i fraksjon E5 og E6.



Figur 6.4: Utbytte av fraksjoner fra EtOAc-ekstraktet

6.3.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon E2-E10 ble analysert ved hjelp av ^1H og ^{13}C NMR, mens fraksjon E11-E13 og bunnfallet ble kun analysert ved hjelp av ^1H NMR.

^1H NMR-spektret av E2 viste signaler som tilhørte protoner på oksygenert karbon ved 3.00-4.00 ppm. Det var også et høyt signal ved 7.20 ppm for aromatisk-og olefiniske protoner. Spektret inneholdt få eller nesten ingen signaler for alifatiske protoner. ^{13}C NMR-spektret viste samme resultat som ^1H NMR-spektret. Signaler ble observert i olefin-og aromatområdet (108-170 ppm). I tillegg var det signaler i karbohydratområdet og andre oksygenerte karbonatomer (50-100 ppm). Kun to signaler ble observert for alifatiske karboner (35-45 ppm).

Spektrene av fraksjon E3, E4 og E5 var like. Ved sammenligning med fraksjon E2 viste det seg at ^1H NMR-spektrene til E3, E4 og E5 hadde flere signaler for aromatiske- og olefiniske protoner (6.00-7.70 ppm). Det var også noen flere signaler for protoner på oksygenert karbon (3.20-4.00 ppm). Få signaler ble observert for alifatiske protoner. ^{13}C NMR-spektrene til E3, E4 og E5 inneholdt mange signaler i aromat-og olefinområdet. I tillegg var det mange signaler for karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer. Det var ett eller to signaler for alifatiske karboner.

Fraksjon E6-E10 hadde ganske like spektre. I ^1H NMR-spektrene var det signaler ved 5.40-8.10 ppm som kunne komme fra aromatiske og olefiniske protoner. Det var også signaler ved 3.00-4.00 ppm som trolig stammet fra protoner på oksygenert karbon. Et signal ble observert ved 0.90 ppm og dette kunne tyde på rhamnose. ^{13}C NMR-spektrene viste mange signaler i aromat-og olefinområdet (100-180 ppm). Det var også mange signaler for karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer (62-100 ppm). Et signal ved 17 ppm ble observert for alifatiske karboner.

Spektrene av fraksjon E11 og E12 var også ganske like. ^1H NMR-spektrene hadde signaler som lå i aromat-og olefinområdet (5.30-8.20 ppm). Det var også signaler ved 3.00-4.40 ppm for protoner på oksygenert karbon. Ved 0.80-2.50 ppm var det signaler for alifatiske protoner.

^1H NMR-spektret til fraksjon E13 inneholdt mest signaler ved 0.80-2.40 ppm for alifatiske protoner. Det var noen få signaler i området for protoner på oksygenert karbon (2.70-4.30 ppm). I aromat-og olefinområdet (5.30-8.10 ppm) fantes det små signaler eller støy. Signalet ved 2.1 ppm kom sannsynligvis fra aceton.

^1H NMR-spektret til E15 (bunnfallet) bestod av signaler for alifatiske protoner (0.8-2.4 ppm). Det var i tillegg et høyt signal i karbohydratområdet (3.67 ppm). Signalet ved 7.25 ppm kom trolig fra kloroform.

Basert på NMR-spektrene var fraksjon E2-E10 de mest interessante fraksjonene. Spektrene viste flest signaler i aromat-og olefinområdet og for protoner på oksygenert karbon. Dette kunne tyde på at fraksjonene inneholdt aromatiske glykosider. Fraksjon E1 ble ikke analysert ved NMR-spektroskopi siden fraksjonen veide lite og derfor var lite interessant. Fraksjon E14 ble heller ikke analysert. De siste fraksjonene inneholdt lite av aromatiske-og olefiniske

stoffer, derfor var det sannsynlig at fraksjon E14 også inneholdt lite av de stoffene vi var ute etter.

6.3.3 Bioassay

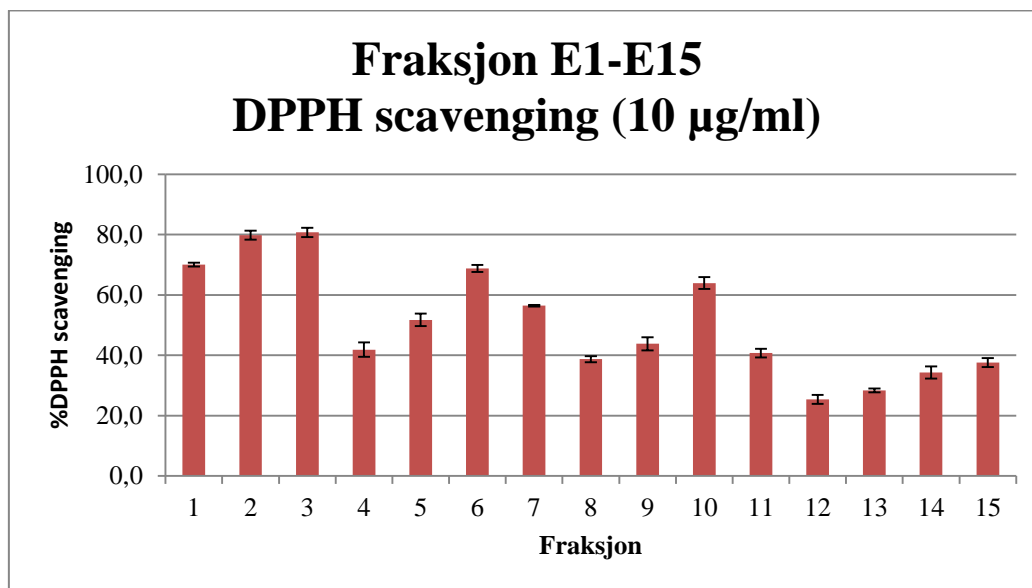
DPPH-test

DPPH-test ble utført for alle fraksjoner (se tabell 6.8). Det ble brukt en konstant konsentrasjon på 10 µg/ml. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 4.3 \pm 0.2$ µg/ml eller 14.1 ± 0.5 µM).

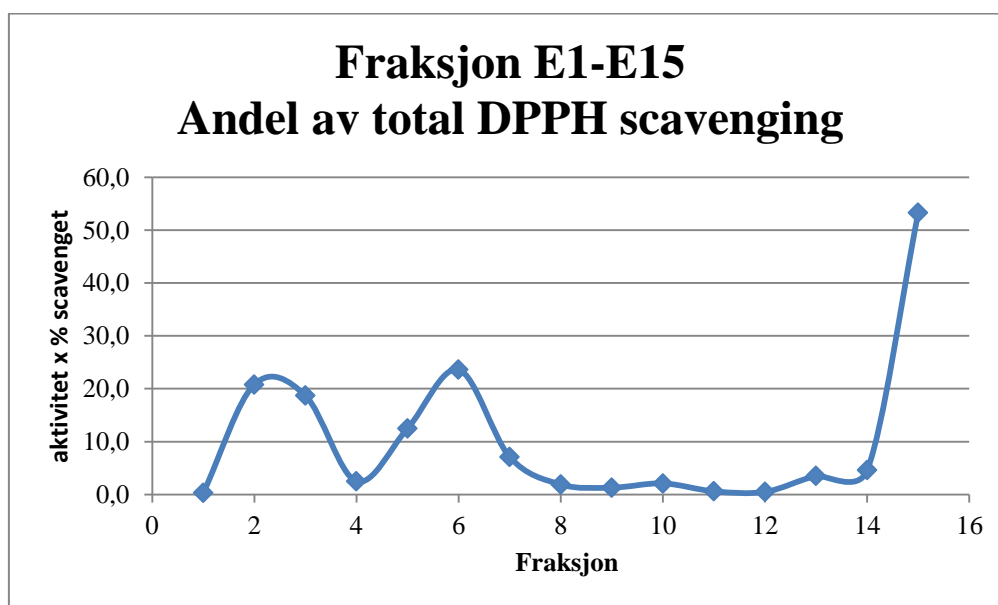
Tabell 6.8: DPPH-test av fraksjon E1-E15

Fraksjon	Vekt (mg)	Hemming ved 10 µg/ml (%)	Standardavvik (%)	Vekt x % hemming	% av total aktivitet
E1	10	70	0.6	700	0.3
E2	700	79.8	1.4	55860	20.8
E3	620	80.7	1.6	50034	18.7
E4	160	41.9	2.4	6704	2.5
E5	650	51.7	2.1	33605	12.5
E6	920	68.8	1.2	63296	23.6
E7	340	56.4	0.3	19176	7.1
E8	130	38.7	1	5031	1.9
E9	80	43.8	2.2	3504	1.3
E10	90	63.9	1.9	5751	2.1
E11	40	40.7	1.4	1628	0.6
E12	50	25.3	1.5	1265	0.5
E13	330	28.3	0.6	9339	3.5
E14	360	34.3	2	12348	4.6
E15	3800	37.6	1.4	142880	53.3

Det var fraksjon E1, E2, E3, E6 og E10 som hadde høyest radikalscavenger aktivitet ved konsentrasjonen 10 µg/ml (se figur 6.5). Da det ble tatt hensyn til vekten av hver fraksjon og graden av radikalscavenger aktivitet, viste det seg at fraksjon E2, E3, E6 og E15 hadde høyest % av total DPPH-aktivitet (se figur 6.6). Fraksjon E15 hadde høy % av total aktivitet fordi vekten til fraksjonen var mye større enn for de andre fraksjonene. Av de testede fraksjonene virket de første fraksjonene som mest interessante med hensyn til mengde stoff, % hemming og % av total aktivitet. De første fraksjonene inneholdt sannsynligvis polare stoffer eller middels polare stoffer fra EtOAc-ekstraktet.



Figur 6.5: DPPH-test (% scavenging) av fraksjon E1-E15



Figur 6.6: DPPH-test (% av total aktivitet) av fraksjon E1-E15

6.3.4 Analytisk HPLC

Kromatogrammer fra analytisk HPLC viste at fraksjon E1 hadde få topper ved 230, 280 og 340 nm. Fraksjon E2, E3 og E4 fikk en fin topp med høy intensitet ved 340 nm. Fraksjon E5 og E6 hadde dårlig separerte topper ved de testede bølgelengdene. Fra og med fraksjon E7-

E14 var toppene i kromatogrammene dårlig separerte og hadde lav intensitet. Fraksjon E15 viste ingen interessante topper i kromatogrammet.

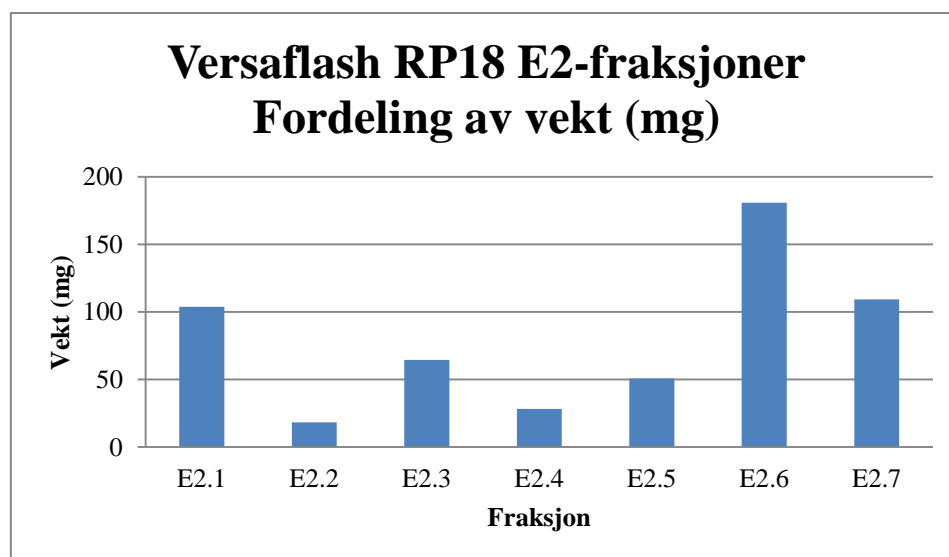
6.3.5 Videre arbeid

På bakgrunn av ^1H -og ^{13}C NMR-spektrene, bioassay og analytisk HPLC ble fraksjon E2 og E6 valgt ut og gått videre med. NMR-spektrene til disse inneholdt signaler i aromat-og olefinområdet, noe som var svært interessant for oss. I tillegg hadde fraksjonene store mengder stoff og god radikalscavenger aktivitet.

6.4 Separasjon av fraksjon E2

6.4.1 Versaflash kolonneseparasjon

Med 549 mg stoff ble fraksjon E2 applisert på en omvendt-fase kolonne og det ble samlet 24 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av analytisk TLC og DPPH-spraying ble disse kolonnefraksjonene slått sammen til fraksjon E2.1-E2.7. Det samlede utbyttet var 555 mg (101 %). Fraksjon E2.1, E2.3, E2.6 og E2.7 var de største fraksjonene (se figur 6.7). Fraksjon E2.1 ble eluert med 10 % vandig MeOH og fraksjon E2.3 ble eluert med 20 % vandig MeOH. Fraksjon E6 og E7 ble eluert med 50 % og 100 % MeOH.



Figur 6.7: Utbytte av fraksjoner fra E2

6.4.2 Bioassay

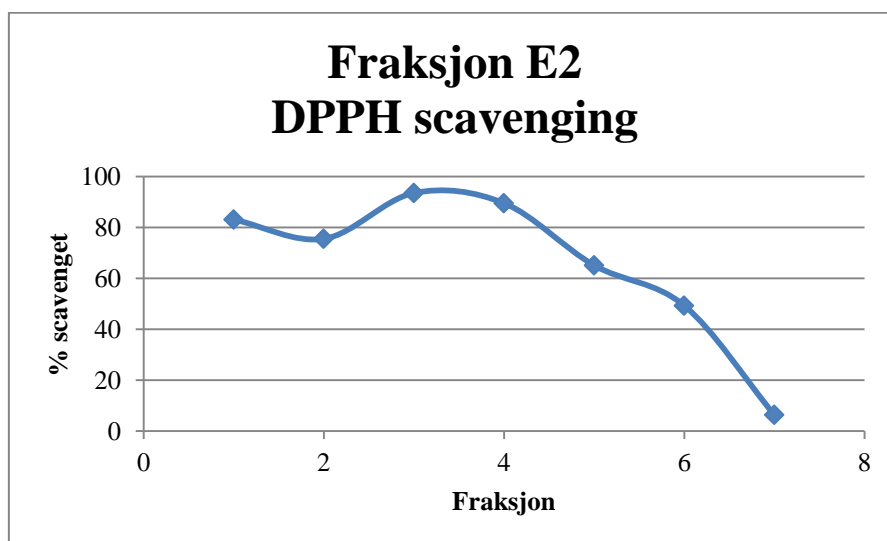
DPPH-test

Fraksjon E2.1-E2.7 ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.9). Det ble brukt en konsentrasjon på 10 µg/ml. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 2.3 \pm 0.1$ µg/ml eller 7.7 ± 0.3 µM). IC_{50} -verdien til quercetin var litt lavere enn tidligere. Årsaken til dette kunne være unøyaktig innveiling av quercetin.

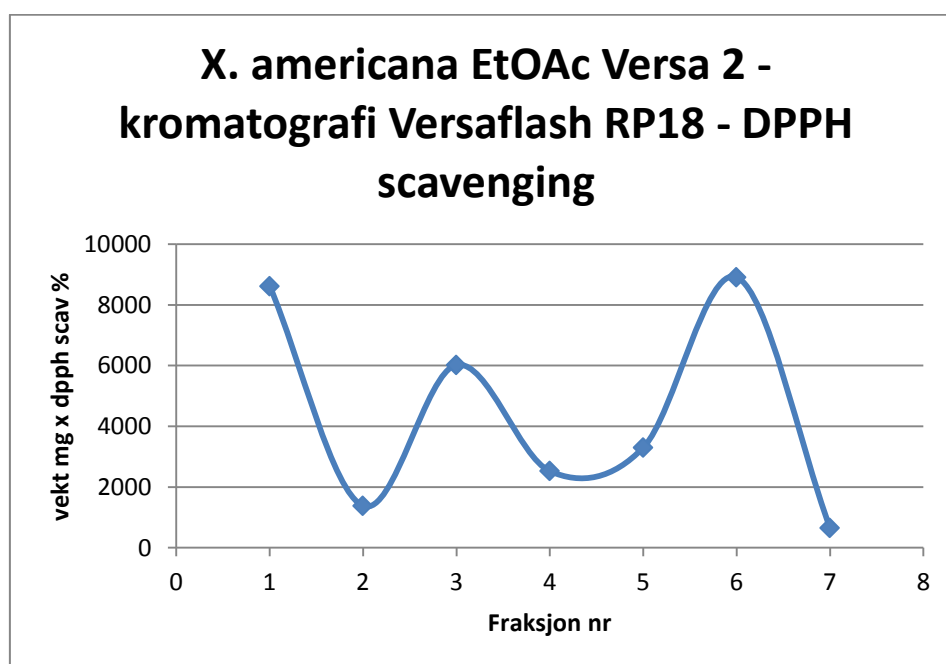
Tabell 6.9: DPPH-test av fraksjon E2.1-E2.7

Fraksjon	Vekt (mg)	Hemming ved 10 µg/ml (%)	Standardavvik (%)	Vekt x % hemming	% av total aktivitet
E2.1	103.7	83.1	0.5	8617	27.4
E2.2	18.3	75.5	2.8	1382	4.4
E2.3	64.4	93.5	1.4	6021	19.2
E2.4	28.2	89.5	2.1	2524	8
E2.5	50.7	65.1	4.4	3301	10.5
E2.6	180.7	49.3	1.3	8909	28.4
E2.7	109.3	6.4	0.5	652	2

Verdiene i tabellen viste at nesten alle fraksjoner hadde høy hemming av DPPH, med unntak av fraksjon E2.7. Disse fraksjonene inneholdt polare og middels polare stoffer. Fraksjon E2.3 hadde høyest radikalscavenger aktivitet og graden av scavenging ble redusert med økende fraksjonsnummer (se figur 6.8). Ved å se på % av total aktivitet, var det fraksjon E2.1, E2.3 og E2.6 som hadde høyest aktivitet (se figur 6.9). Dette skyldtes at fraksjonene hadde store mengder stoff og for fraksjon E2.1 og E2.3 høy hemmingsaktivitet.



Figur 6.8: DPPH-test (% hemming) av fraksjon E2.1-E2.7



Figur 6.9: DPPH-test (% av total aktivitet) av fraksjon E2.1-E2.7

6.4.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR for alle fraksjoner og ^{13}C NMR av fraksjon E2.1-E2.4.

NMR-spektrene av fraksjon E2.1 indikerte at fraksjonen inneholdt en hovedforbindelse, samt mindre mengder andre stoffer. Det var et høyt signal ved 7.09 ppm og to mindre signaler ved 7.41 og 8.54 ppm. I tillegg var det noen små signaler ved 3.00-4.00 ppm, sannsynligvis for

protoner på oksygenert karbon. ^{13}C NMR-spektret viste fire små signaler i området for alifatiske karboner (34-43 ppm) og noen små signaler for karbohydrater og andre oksygenerte karboner (52-85 ppm). Det var fire høye signaler ved 110 ppm, 120 ppm, 139 ppm og 146 ppm.

Spektrene for fraksjon E2.2 og E2.3 var ganske like, men fraksjon E2.3 veide mest og hadde et bedre signal-støy forhold. ^1H NMR-spektrene til fraksjonene hadde høye signaler ved 7.09 ppm og noen lavere signaler ved 5.69 ppm (aromatiske og olefiniske protoner). Det var også mange signaler ved 3.50-4.70 ppm (protoner på oksygenert karbon). ^{13}C NMR-spektrene viste signaler for karbohydrater og andre oksygenerte karboner (55-95 ppm). Det var også signaler i aromat- og olefinområdet (93-175 ppm).

Fraksjon E2.4 hadde også høye signaler ved 7.09 ppm i ^1H NMR-spektret (aromatiske og olefiniske protoner) og noen flere signaler ved 5.57-6.10 ppm (protoner på oksygenert karbon). ^{13}C NMR-spektret viste små signaler for alifatiske karboner. Ellers var det flere signaler for karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer. I aromat- og olefinområdet var det også observert en del signaler.

Fraksjon E2.5, E2.6 og E2.7 var uinteressante for videre arbeid.

6.4.4 Videre arbeid

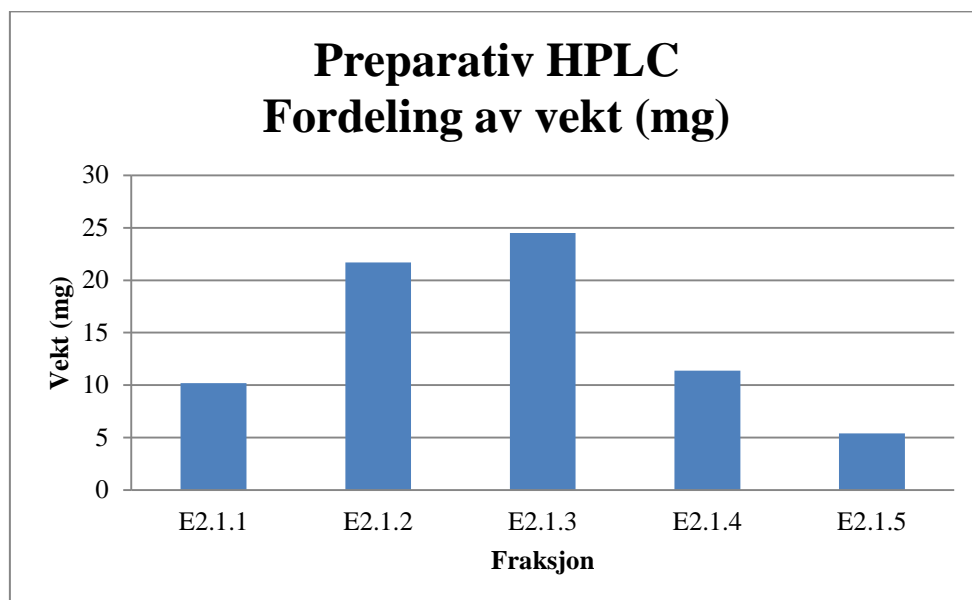
Resultater fra DPPH-testen, NMR-spektrene og analytisk HPLC tydet på at fraksjon E2.1, E2.3 og E2.4 var mest interessante, og de ble prioritert for videre opprensing.

6.5 Separasjon av fraksjon E2.1

6.5.1 Preparativ HPLC

Fraksjon E2.1 på 98.2 mg ble rensert opp med preparativ HPLC for å isolere renstoffer fra fraksjonen. Det ble samlet opp kolonnefraksjoner basert på absorbanstopper registrert i kromatogrammet. Kolonnefraksjonene ble deretter analysert ved analytisk HPLC for å slå sammen fraksjoner som kunne inneholde samme stoffer.

Det ble slått sammen til fem fraksjoner. Disse ble kalt fraksjon E2.1.1-E2.1.5. Det samlede utbyttet var 73.2 mg (75 %). Tap av stoff kunne skyldes at stoffer ble sittende i kolonnen. Fraksjon E2.1.2 og E2.1.3 veide mest (se figur 6.10).



Figur 6.10: Utbytte av fraksjoner fra E2.1

6.5.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -og ^{13}C NMR av alle fraksjoner. I tillegg ble det tatt HMQC av fraksjon E2.1.1.

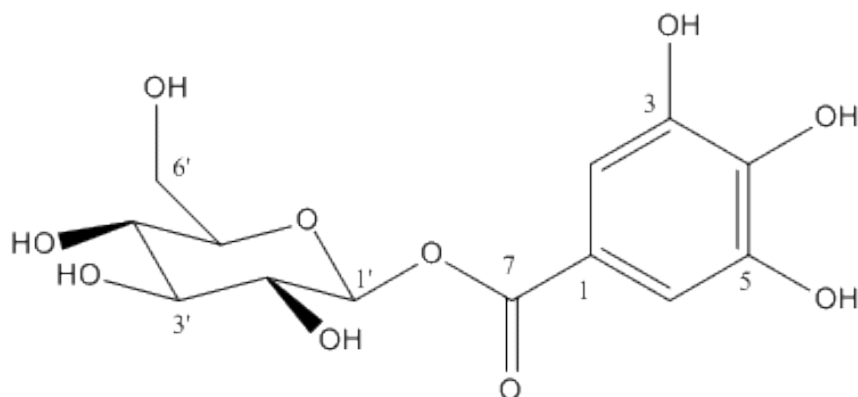
Fraksjon E2.1.1 ble identifisert som β -D glukogallin (se vedlegg, NMR-spekter 9-10), og fraksjon E2.1.2 og E2.1.3 ble identifisert som gallesyre (se vedlegg, NMR-spekter 11-13). Identifiseringen var delvis basert på tolkning av spektraldataene. Ved søk i SciFinder og ved sammenligning med spektraldata i litteraturen ble den endelige strukturen bestemt.

Fraksjon E2.1.4 og E2.1.5 hadde uinteressante spektre og derfor ble det ikke gått videre med disse fraksjonene.

6.5.3 β -D glukogallin

β -D-glukogallin er en forbindelse som er avledet av gallesyre og glukose (gallotannin) (se figur 6.11). Gallesyre-avledede forbindelser er sekundære polyfenoliske metabolitter som er naturlige antioksidanter. Forbindelsene har vanligvis biologiske og farmakologiske aktiviteter, dette inkluderer scavenging av fri radikaler og induksjon av apoptose i kreftceller (Pawlowska

et al. 2006). β -D-glukogallin er ikke tidligere blitt identifisert i *X.americana*. Dette ble undersøkt i databasene SciFinder og Google Scholar.



Figur 6.11: Molekylstruktur for β -D glukogallin (molekylvekt: 332.26 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert β -D glukogallin er gitt i tabell 6.10. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for β -D glukogallin er gitt i tabell 6.11 og 6.12.

Tabell 6.10: Tolkning av spektrene til isolert β -D glukogallin

$^1\text{H NMR}^*$	
Singlett ved 1.29	Fettforurensning
Signaler ved 3.35-4.00	Protoner i sukkerdelen (H-2' - H-6')
Dublett ved 5.65 (J= 7.9)	Integral viser ett proton. Det er anomerprotonet i sukkerdelen (H-1')
Singlett ved 7.12	I aromatområdet. Integral viser to hydrogen. Det er to identiske aromatiske protoner. (H-2 og H-6)
$^{13}\text{C NMR}^*$	
Signal ved 96.0	Anomerkarbonet C-1' i sukkerdelen
Signal ved 62.3	C-6' i sukkerdelen
Signaler ved 71-78	Karboner i sukkerdelen (C-2' – C-5')
Signal ved 110.6	Aromatkarboner (C-2 og C-6)

* δ -skala gitt i ppm

På grunn av liten stoffmengde ble ikke signaler fra substituerte aromatkarboner observert.

Tabell 6.11: Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for β -D glukogallin (Pawlowska et al. 2006)

Posisjon	Observert	Litteratur
1'	5.65 (1H, d, J=7.9)	5.60 (1H, d, J=7.5)
2 og 6	7.12 (2H, s)	7.12 (2H, s)

Tabell 6.12: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for β -D glukogallin (Pawlowska et al. 2006)

Posisjon	Observert	Litteratur
6'	62.3	62.4
4'	71.1	71.1
2'	74.1	74.1
3'	78.2	78.2
5'	78.8	78.8
1'	96.0	96.0
2 og 6	110.6	110.6
1		120.8
4		140.4
3 og 5		146.5
7		167.1

6.5.4 Bioassay

DPPH-test

β -D glukogallin ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.13). På grunn av lite stoff ble det ikke mulig å gjennomføre 15-LOX hemming og XO hemming. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($\text{IC}_{50} = 3.3 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{M}$).

Tabell 6.13: DPPH-test på β -D glukogallin

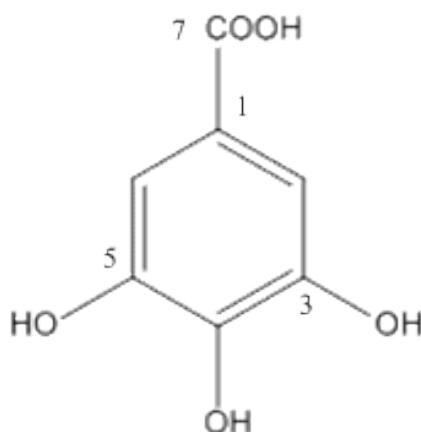
Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
4.8	80	50.1	1.7	$80 \pm 6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ($241 \pm 18 \text{ } \mu\text{M}$)
3	50	34.7	1.2	

β -D glukogallin var en mye svakere radikalscavenger enn quercetin. IC_{50} -verdien for β -D glukogallin var $241 \text{ } \mu\text{M}$ (på vektbasis $80 \text{ } \mu\text{g/ml}$). Verdien stemmer ikke med tidligere funn (Yokozawa et al. 1998). Lav scavenger aktiviteten kan skyldes at forbindelsen har et sukker i

molekylet som reduserer scavenger aktiviteten. Gallotanniner/hydrolyserbare tanniner har vanligvis antioksidant effekter og har evne til å felle proteiner (for eksempel enzymer, sopp og virale proteiner). β -D glukogallin mangler disse egenskapene på grunn av sin lave molekylvekt.

6.5.5 Gallesyre

Gallesyre (3,4,5-trihydroksybenzosyre) er en fenolisk syre (se figur 6.12) og har radikalscavenger aktivitet. Forbindelsen hindrer peroksidering av fosfolipidmembranen, og beskytter mot oksidativ skade og inflammasjon (Kumaraswamy et al. 2010). Det er også rapportert at gallesyre har antibakteriell og antifungal aktivitet (Abah og Abah 2010). Gallesyre er blitt rapportert i flere planter, men ikke i *X.americana*.



Figur 6.12: Molekylstruktur for gallesyre (molekylvekt: 170.12 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert gallesyre er gitt i tabell 6.14. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for gallesyre er gitt i tabell 6.15 og 6.16.

Tabell 6.14: Tolkning av spektrene til isolert gallesyre

¹ H NMR*	
Singlett ved 7.06	To identiske aromatiske protoner (H-2 og H-6)
¹³ C NMR*	
Signal ved 110.31	Stort signal i aromatområdet. Tilsvarende to usubstituerte karboner (C-2 og C-6)
Signal ved 121.96	C-1 i en aromat
Signal ved 139.57	C-4 i en aromat, hydroksylert

Signal ved 146.37	Middels stort signal. C-3 og C5 i en aromat, hydroksylert
Signal ved 170.38	Karbonyl C-7
HMOC* (viser koblingen mellom proton og karbon)	
Signal ved 7.06 og 110.31	Protonene ved 7.06 og karbonene ved 110.31 er bundet til hverandre

* δ - skala gitt i enheten ppm

Tabell 6.15: Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for gallesyre (Zhang et al. 2004)

Posisjon	Observert	Litteratur
	7.06 (s)	7.07 (2H, s)

Tabell 6.16: Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data med data for gallesyre (Zhang et al. 2004)

Posisjon	Observert	Litteratur
2 og 6	110.31	110.3
1	121.96	122.0
4	139.57	139.8
3 og 5	146.37	146.4
7	170.38	170.4

6.5.6 Bioassay

DPPH-test

Gallesyre ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.17). Det ble brukt kommersiell gallesyre under forsøkene. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($\text{IC}_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.17: DPPH-test på gallesyre

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
0.3	5	62.9	0.8	$3.0 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ ($17.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$)
0.15	2.5	45.8	1.8	

Gallesyre var en svært god radikalscavenger og hadde høyere radikalscavenger aktivitet enn quercetin på vektbasis, men hadde lavere aktivitet enn quercetin på molarbasis. IC_{50} -verdien

på 3 µg/ml stemte bra med tidligere funn (Kumaraswamy et al. 2010). Den gode radikalscavenger aktiviteten til gallesyre skyldtes at forbindelsen hadde tre hydroksylgrupper bundet til en aromaring, og disse hydroksylgruppene stod i orto-posisjon i forhold til hverandre (Sroka og Cisowski 2003).

15-LOX hemming

15-LOX hemming ble utført på kommersiell gallesyre (se tabell 6.18). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9$ µg/ml eller 56.9 ± 3.0 µM).

Tabell 6.18: 15-LOX hemming på gallesyre

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
2.5	41.2	83	1.8	25.7 ± 2.1 µg/ml (151 ± 12.3 µM)
1.25	20.8	36.4	6.8	

Gallesyre hadde god 15-LOX hemming på vektbasis, men svakere hemming på molarbasis sammenlignet med quercetin. IC_{50} -verdien til gallesyren stemmer ikke helt med tidligere funn (Kumaraswamy et al. 2010), noe av grunnen kunne være at testene ikke ble utført helt likt.

XO hemming

Kommersiell gallesyre ble også testet for XO hemming (se tabell 6.19). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 1.0 \pm 0.1$ µg/ml eller 3.3 ± 0.3 µM).

Tabell 6.19: XO hemming på gallesyre

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
20	333.3	32.9	2.2	> 333 µg/ml (>1957 µM)

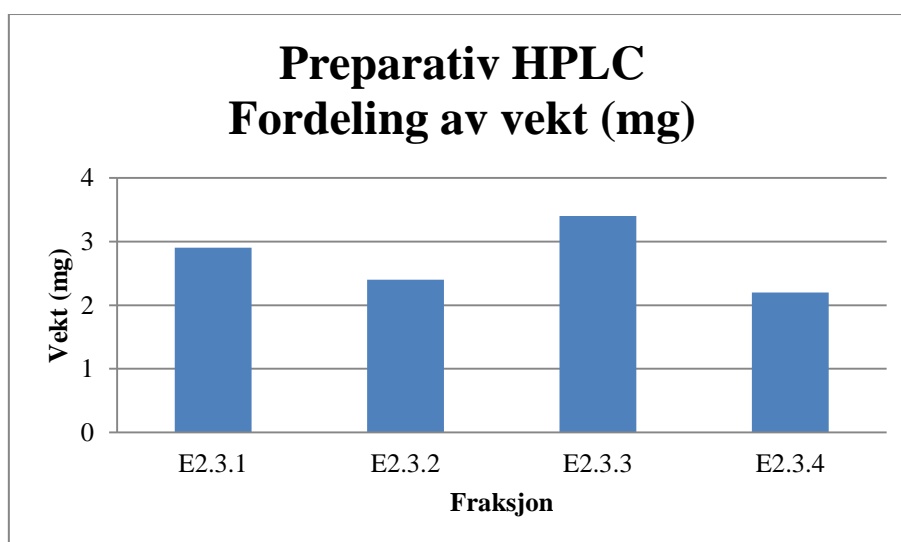
Verdiene i tabellen viste at gallesyre var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon. IC_{50} -verdien var større enn 1957 µM (på vektbasis > 333 µg/ml). Dette tydet på at gallesyre er en dårlig XO hemmer.

6.6 Separasjon av fraksjon E2.3

6.6.1 Preparativ HPLC

Fraksjon E2.3 var på 59 mg. 29.5 mg av fraksjonen ble injisert på C₁₈-kolonnen.

Absorbanstoppene i kromatogrammet så ikke bra ut, det var mange små topper istedenfor høye og separerte topper. Små og tettliggende topper gjorde at det ble vanskelig å samle opp fraksjonene. Analytisk HPLC ble brukt for å undersøke fraksjonene. Det viste seg at stoffene var fortsatt intakte, selv om resultatet fra preparativ HPLC virket mislykket. Det var fire fraksjoner som virket interessante. Disse ble dampet inn og kalt fraksjon E2.3.1-E2.3.4 (se figur 6.13). Det samlede utbyttet var 10.9 mg (37 %). Lavt utbytte skyldtes at noen uinteressante fraksjoner fra preparativ HPLC ikke ble inndampet.



Figur 6.13: Utbytte av fraksjoner fra E2.3

6.6.2 NMR-spektroskopi

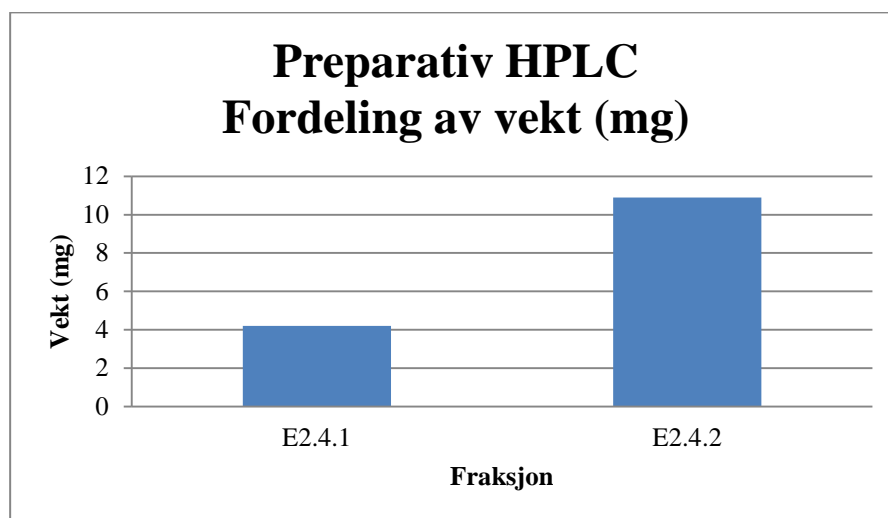
Det ble tatt ¹H NMR av alle fraksjoner og ¹³C NMR av fraksjon E2.3.1 og E2.3.4. Selv om vekta til alle fraksjoner var over 2 mg, ble det vanskelig å tolke spektrene siden det var for få eller for lave signaler. Sannsynligvis var ikke fraksjonene rene, dette ga derfor dårlige signaler.

Fraksjon E2.3.4 ble likevel identifisert som gallesyre. Fraksjonen hadde noenlunde likt ¹H NMR spekter (signal ved 7.04 og 4.57 ppm) og ¹³C NMR-spekter (signaler ved 76 ppm, 80.50 ppm, 80.52 ppm, 110 ppm, 123 ppm og 146 ppm) som tidligere isolert gallesyre (se avsnitt 6.5.5 og 6.5.6 for gallesyre og bioassay).

6.7 Separasjon av fraksjon E2.4

6.7.1 Preparativ HPLC

Preparativ HPLC ble brukt for å rense opp fraksjon E2.4. Det ble injisert 26.6 mg stoff på omvendt-fase kolonnen. Oppsamlete fraksjoner ble videre analysert ved analytisk HPLC. Det var to fraksjoner som virket mest interessante og disse ble kalt E2.4.1 og E2.4.2 (se figur 6.14). Det totale utbyttet var 15.1 mg (57 %). Stoffer kan ha gått tapt fordi det var ikke alle fraksjoner fra preparativ HPLC som ble dampet inn.



Figur 6.14: Utbytte av fraksjoner fra E2.4

6.7.2 NMR-spektroskopi

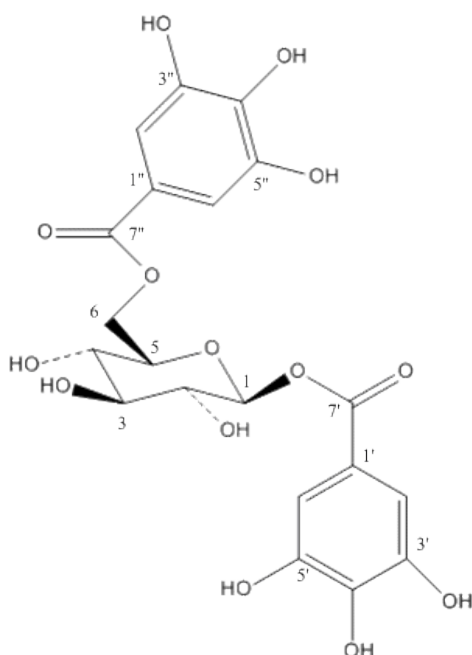
Fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR.

Fraksjon E2.4.1 hadde et uinteressant spekter. Fraksjon E2.4.2 ble identifisert som 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose (se vedlegg, NMR-spekter 14-15). Forbindelsen ble identifisert ved tolkning av spektraldata, og ved søk i SciFinder etter struktur og referanser.

6.7.3 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose

1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose er en diester (gallotannin) som dannes av monogalloylglukose-enheter (β -D glukogallin) (se figur 6.15). Forbindelsen har vist antiviral effekt på human immunsviktivirus (El-Mekkawy et al. 1995) og hemming av to klinisk isolerte stammer fra *Candida albicans*. Den antimikrobielle effekten til 1.6-di-O-galloyl- β -D-

glukopyranose er antatt å skyldes galloyl-enheter i molekylet (De-Leo et al. 2004). 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose er ikke tidligere blitt isolert fra *X.americana*.



Figur 6.15: Molekylstruktur for 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose
(molekylvekt: 484.36 g/ml)

Tolkning av spektraldata for isolert 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose er gitt i tabell 6.20. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose er gitt i tabell 6.21 og 6.22.

Tabell 6.20: Tolkning av spektrene til isolert 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose

¹ H NMR*	
Signaler ved 3.35-4.57	Protoner i sukkerdel (H-2 - H-6)
Dublett ved 5.68 (1H, d, J= 7.2)	Anomerproton ved C-1
Singlett ved 7.07 (2H, s)	To identiske aromatiske protoner (H-2'' og H-6'')
Singlett ved 7.13 (2H, s)	To identiske aromatiske protoner (H-2' og H-6')
¹³ C NMR*	
Signal ved 64.45	C-6 på sukker. Deshieldet på grunn av gallesyre bundet til seg
Signaler ved 71.20-81.16	Sukkerdel (C-2 – C-5)
Signal ved 95.95	Anomerkarbon C-1
Signaler ved 167.00 og 168.32	To karbonyler (C-7' og C-7'')

* δ -skala gitt i ppm

Tabell 6.21: ^1H NMR spektraldata for 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose (Owen et al. 2003)

Posisjon	Observert	Litteratur
4	3.51	3.512 (dd)
2		3.515 (dd)
3	3.52	3.521 (dd)
5	3.71	3.720 (ddd)
1	5.68	5.682 (d)
Glc-6a	4.41	4.400 (dd)
Glc-6b	4.57	4.550 (dd)
2'' og 6''	7.07	7.077 (2H, s)
2' og 6'	7.13	7.131 (2H, s)

Tabell 6.22: ^{13}C NMR spektraldata for 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose (Owen et al. 2003)

Posisjon	Observert	Litteratur
6	64.45	64.516
4	71.20	71.280
2	74.10	74.180
5	76.46	76.547
3	78.04	78.124
1	95.95	96.033
2' og 6'	110.60	110.678 (2C)
1'	120.62	120.730
4'	140.41	140.474
3' og 5'	146.47	146.546 (2C)
7'	167.00	167.062
2'' og 6''	110.20	110.282 (2C)
1''	121.31	121.409
4''	139.87	139.932
3'' og 5''	146.51	146.587 (2C)
7''	168.32	168.379

6.7.4 Bioassay

DPPH-test

1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.23). På grunn av lite stoff ble det ikke utført 15-LOX hemming og XO hemming. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.23: DPPH-test av 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
1.2	20	69	0.7	$12.3 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ ($25.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$)
0.6	10	41.8	0.9	

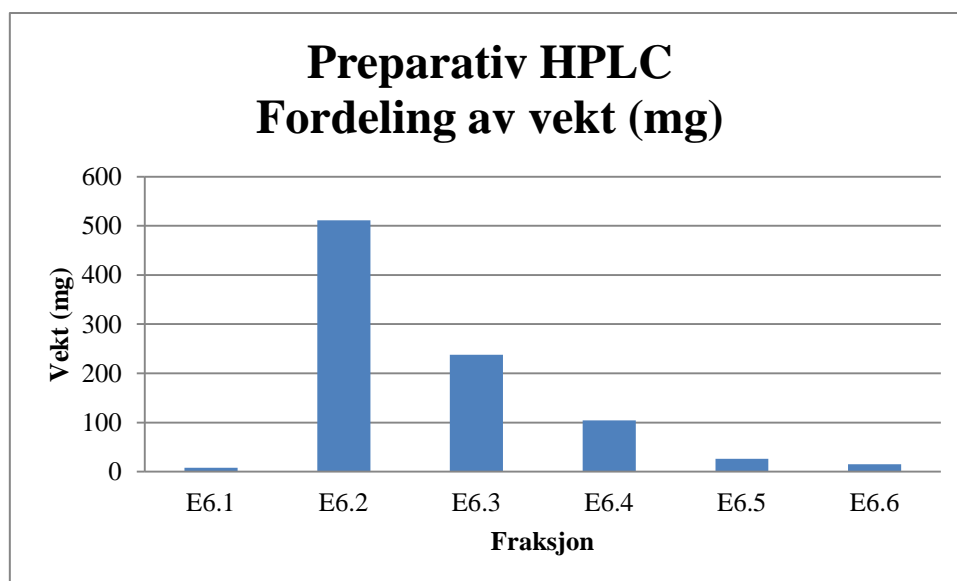
1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose hadde god radikalscavenger aktivitet. Forbindelsen hadde høyere aktivitet sammenlignet med monogalloylglukosen β -D glukogallin, noe som skyldes at 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose har høyere molekylvekt og en ekstra galloylgruppe i molekylet. Generelt øker aktiviteten til tanniner med økt antall galloylgrupper og molekylvekt.

IC_{50} -verdien i forsøket var ikke likt det som stod i litteraturen (Yokozawa et al. 1998). Dette kunne skyldes at DPPH-testen ble utført på forskjellige måter. Det ble brukt isolert 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose i forsøket og i litteraturen, derfor kunne resultatene avvike fra hverandre fordi renheten til de isolerte forbindelsene varierte.

6.8 Separasjon av fraksjon E6

6.8.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon E6 på 915 mg ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 31 kolonnefraksjoner som ved hjelp av analytisk TLC og ceric-spraying ble slått sammen til fraksjon E6.1-E6.6. Det samlede utbyttet var 904 mg (99 %). Fraksjon E2, E3 og E4 var de største fraksjonene (se figur 6.16). Det så ut som stoffene begynte å eluere ut ved 50 % vandig MeOH. Fraksjon E6.2 og E6.3 ble eluert med 50 % vandig MeOH, mens fraksjon E6.4 ble eluert med 50 % og 70 % vandig MeOH.



Figur 6.16: Utbytte av fraksjoner fra E6

6.8.2 Bioassay

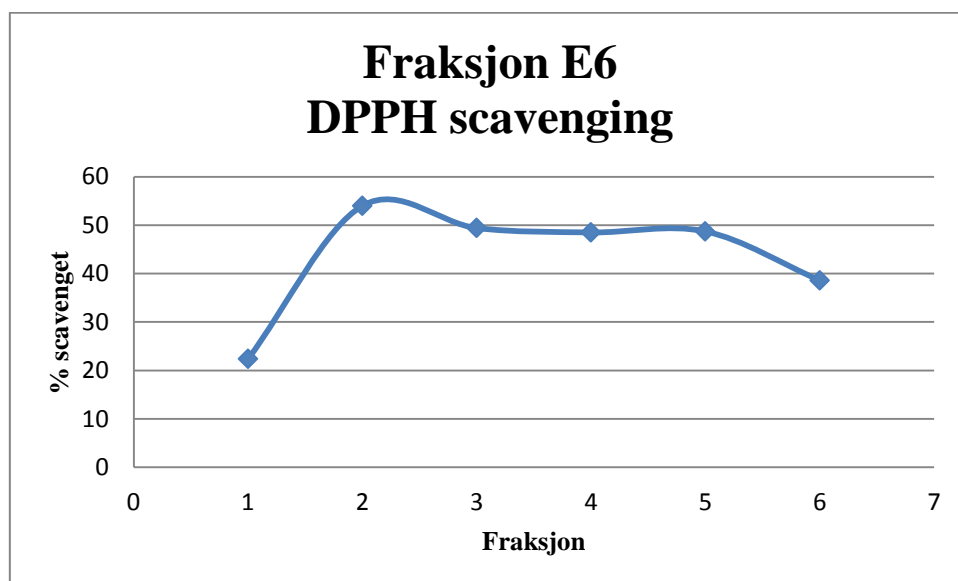
DPPH-test

Fraksjonene ble testet for radikalscavenging ved en konstant konsentrasjon på 10 µg/ml (se tabell 6.24). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.1 \pm 0.2$ µg/ml eller 10.4 ± 0.7 µM).

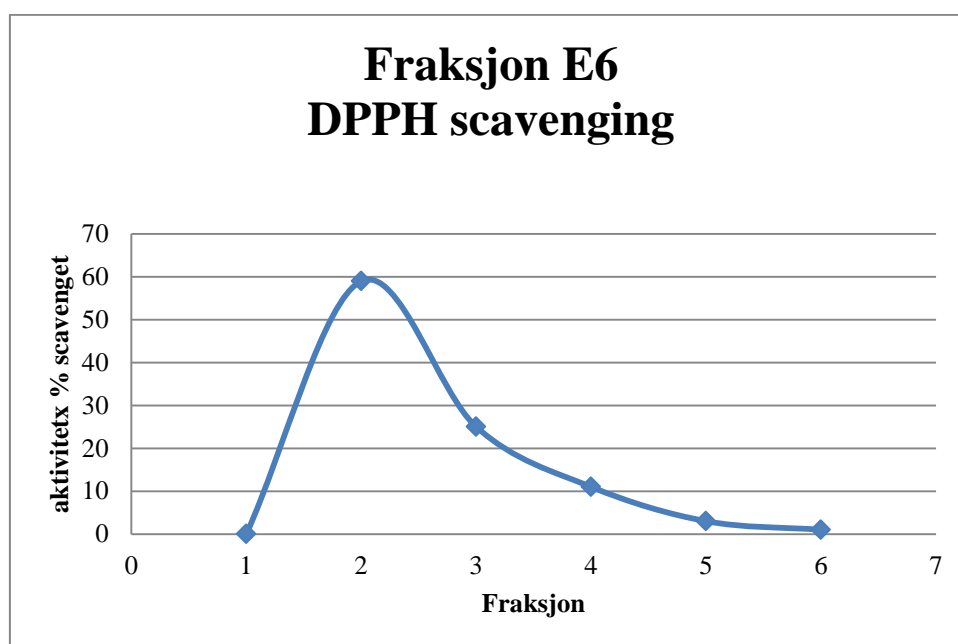
Tabell 6.24: DPPH-test av fraksjon E6.1-E6.6

Fraksjon	Vekt (mg)	Hemming ved 10 µg/ml (%)	Standardavvik (%)	Vekt x % hemming	% av total aktivitet
E6.1	7.8	22.4	0.8	175	0
E6.2	511.3	54	1.2	27610	59
E6.3	238.1	49.4	1.4	11762	25
E6.4	104.4	48.5	0.4	5063	11
E6.5	26.5	48.7	1.3	1291	3
E6.6	15.4	38.6	1.8	594	1

Verdiene i tabellen viste at hemmingsaktiviteten var høy ved fraksjon E6.2 og graden minket med økende fraksjonsnummer (se figur 6.17). Dette tydet på at de mest polare stoffene bidro til scavenging av DPPH-radikalet. Fraksjon E6.1 hadde lavest hemmingsaktivitet, noe som kunne skyldes at det var lite stoffer som ble eluert ut av kolonnen ved det tidspunktet. Ved å se på total aktivitet så var det klart at fraksjon E6.2 og E6.3 hadde mest aktivitet (se figur 6.18).



Figur 6.17: DPPH-test (% hemming) av fraksjon E6



Figur 6.18: DPPH-test (% av total aktivitet) av fraksjon E6

6.8.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR og ^{13}C NMR av fraksjon E6.2-E6.4 siden fraksjonene hadde høyest aktivitet i DPPH-testen. Spektrene for fraksjon E6.2 og E6.3 var veldig like. I ^1H NMR-spektrene hadde fraksjonene signaler ved 0.96-0.98 ppm. Signaler for H-6 på rhamnose finnes vanligvis i dette området. Ved 3.50-4.50 ppm var det signaler for protoner på oksygenert karbon. Det var også mange signaler i aromat-og olefinområdet (5.40-8.00 ppm). ^{13}C NMR-

spektrene hadde et signal ved 17.6 ppm som kunne tilhøre karbon fra C-6 på rhamnose. I tillegg var det mange signaler i området for karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer (62-100 ppm). Det ble også observert signaler i aromat-og olefinområdet (100-180 ppm).

Spektrene av fraksjon E6.4 viste de samme signalene som ble sett i fraksjon E6.2 og E6.3. Men i ^{13}C NMR-spektret hadde fraksjon E6.4 færre signaler i aromat-og olefinområdet. Det var også færre signaler av karbohydrater.

6.8.4 Videre arbeid

DPPH-testen og NMR-data tydet på at fraksjon E6.2, E6.3 og E6.4 var interessante fraksjoner. Siden fraksjon E6.2 og E6.3 så ut til å inneholde samme stoff, ble de slått sammen og kalt fraksjon E6.2-3. Denne fraksjonen ble prioritert til videre opprensing.

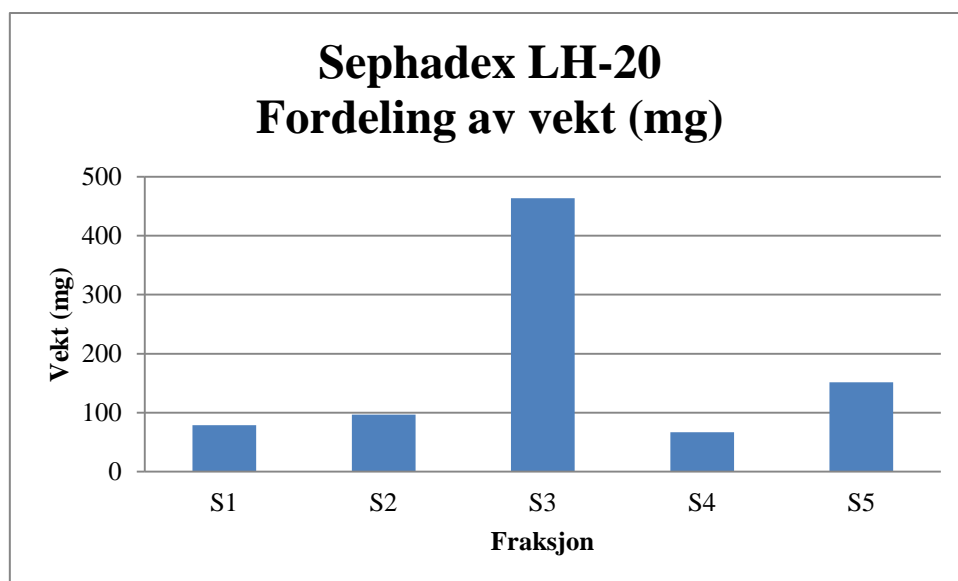
6.9 Separasjon av fraksjon E6.2-3

6.9.1 Sephadex LH-20 kolonne separasjon

Vi ønsket å prøve en ny separasjonsmetode, derfor ble Sephadex LH-20 benyttet ved isolering og opprensing av fraksjon E6.2-3. Polariteten til kolonnematerialet ligger mellom normalfase og omvendt-fase, fordi kolonnematerialet har både lipofile og hydrofile egenskaper.

Fraksjonering med Sephadex LH-20 ga 21 kolonnefraksjoner. Sephadex LH-20 isolerte stoffene etter molekyllstørrelse, slik at de største molekylerne ble eluert ut først. Siden adsorpsjonseffekter også oppstår, ble lavmolekylære og aromater eluert ut sist. Fraksjonene ble applisert på en omvendt-fase TLC-plate og eluert med 50 % vandig MeOH. Det viste seg at elueringsmidlet var litt svakt siden stoffene ikke vandret langt på platen. Allikevel var det ikke noe problem å bestemme hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. De 21 kolonnefraksjonene ble slått sammen til fraksjon S1-S5 på bakgrunn av analytisk TLC.

Det ble applisert 734.4 mg og det samlede utbyttet var 857 mg (117 %). Grunnen til at utbyttet var over 100 % var trolig at plastmykneren bis(2-etylheksyl)ftalat ble eluert ut av kolonnen sammen med prøven. Fraksjon S3 utgjorde den største fraksjonen (se figur 6.19).



Figur 6.19: Utbytte av fraksjoner fra E6.2-3

6.9.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR, unntatt fraksjon S4 hvor det ble bare tatt ^1H NMR.

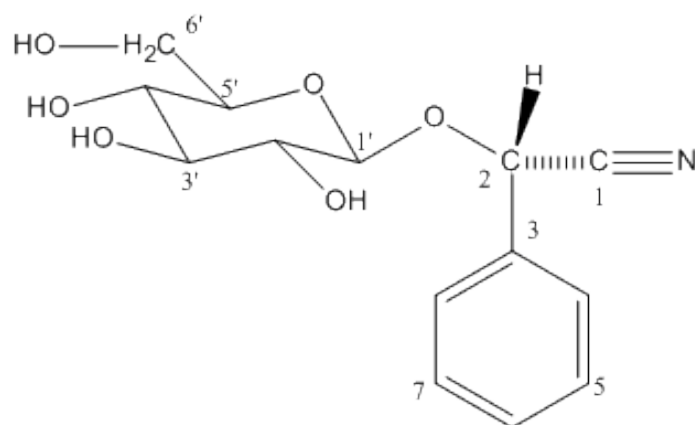
Fraksjon S2 og S3 hadde signaler for alifatiske protoner (0.91-1.35 ppm) og protoner på oksygenert karbon (3.20-4.70 ppm). Signaler ble også observert ved aromat-og olefinområdet. Fraksjon S4 og S5 inneholdt plastmyknere ftalat som kunne ses ved 7.50-8.00 ppm som dobbeldubletter.

Fraksjon S1 ble identifisert som sambunigrin (se vedlegg, NMR-spekter 16-17).

Identifiseringen var basert på tolkning av spektrene og ved sammenligning med litteratordata for sambunigrin.

6.9.3 Sambunigrin

Sambunigrin (mandelonitril glukosid) er et cyanogent glukosid som er tidligere blitt isolert fra *X.americana* (Finnermore og Cooper 1938) (se figur 6.20). Cyanogene glukosider kan produsere hydrogencyanid ved hydrolyse. Selv om hydrogencyanid er giftig, vil ikke nødvendigvis oralt inntak føre til alvorlig forgiftning. Det er kun farlig ved rask og massiv inntak av plantedeler rike på cyanogene glukosider.



Figur 6.20: Molekylstruktur av sambunigrin (molekylvekt:295.29 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert sambunigrin er gitt i tabell 6.25. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for sambunigrin er gitt i tabell 6.26 og 6.27.

Tabell 6.25: Tolkning av spektrene til isolert sambunigrin

¹ H NMR*	
Signaler ved 3.38-3.94	Protoner i sukkerdel (og MeOH signaler) (H-2' - H-6')
Dublett ved 4.69 (1H, J= 7.6)	Integral gir ett proton. Anomerprotonet (H-1')
Singlett ved 6.04 (1H)	Integral gir ett proton. Deshieldet, sannsynlig et proton som er bundet til elektrontiltrekkende grupper (H-2)
Signaler ved 7.43-7.59 (5H)	Signaler for aromat (H-4 – H-8)
¹³ C NMR*	
Signal ved 62.8	C-6' i sukker
Signaler ved 62.8-78.5	Sukker (C-2' – C-5')
Signal ved 102.0	Anomerkarbon (C-1')
Signaler ved 118.5-135.2	Karboner i aromatring (C-3 – C-8)

*δ-skala gitt i ppm

Tabell 6.26: Sammenligning av observerte ¹H NMR data med data for sambunigrin (Dellagreca et al. 2002)

Posisjon	Observert	Litteratur
2	6.04 (s)	6.05 (1H, s)
5, 6 og 7	7.43	7.44 (3H, m)
4 og 8	7.59 (m)	7.61 (2H, m)

2' og 4'	3.26 (m)	3.28 (m)
3'	3.41	3.40 (1H, dd, J=9.1 og 9.2)
5'	3.44	3.44 (1H, ddd, J=1.4, 5.5 og 9.8)
6'	3.94 (dd, J=1.7, 11.9) 3.68 (dd, J=6.1, 11.9)	3.96 (1H, dd, J=1.4 og 11.2) 3.70 (1H, dd, J=5.5 og 11.2)
1'	4.69 (d, J=7.6)	4.69 (1H, d, J=7.8)

Tabell 6.27: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for sambunigrin (Dellagreca et al. 2002)

Posisjon	Observert	Litteratur
2	68.5	69.5
1	118.5	119.4
5 og 7	129.9	129.9
4 og 8	128.7	131.1
6	130.7	131.9
3	135.2	135.8
6'	62.8	63.7
4'	71.5	72.5
2'	74.7	75.7
5'	78.5	78.9
3'	77.9	79.5
1'	102.0	103.0

6.9.4 Bioassay

DPPH-test

Sambunigrin ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.28). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($\text{IC}_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.28: DPPH-test på sambunigrin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
4.8	80	59.5	2.3	$60 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ ($203 \pm 10 \mu\text{M}$)
2.4	40	36.5	0.2	

Sambunigrin hadde dårlig radikalscavenging aktivitet i forhold til quercetin. IC_{50} -verdien var 203 μM (på vektbasis 60 $\mu g/ml$). Et søk i SciFinder tydet på at sambunigrin ikke er blitt testet for DPPH-scavenging tidligere.

15-LOX hemming

Det ble utført 15-LOX hemming på sambunigrin (se tabell 6.29). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9 \mu g/ml$ eller $56.9 \pm 3 \mu M$).

Tabell 6.29: 15-LOX hemming på sambunigrin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu g/ml$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
10	167	91	5.4	$90 \pm 6 \mu g/ml$ ($305 \pm 22 \mu M$)
5	83	44.4	4.7	

Sambunigrin hadde også dårlig hemming på 15-LOX i forhold til quercetin. IC_{50} -verdien var 305 μM (på vektbasis 90.2 $\mu g/ml$).

XO hemming

Sambunigrin ble testet for XO hemming (se tabell 6.30). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \mu g/ml$ eller $3.3 \pm 0.3 \mu M$).

Tabell 6.30: XO-hemming på sambunigrin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu g/ml$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
20	333	1.3	2.4	$> 333 \mu g/ml$ ($> 1128 \mu M$)

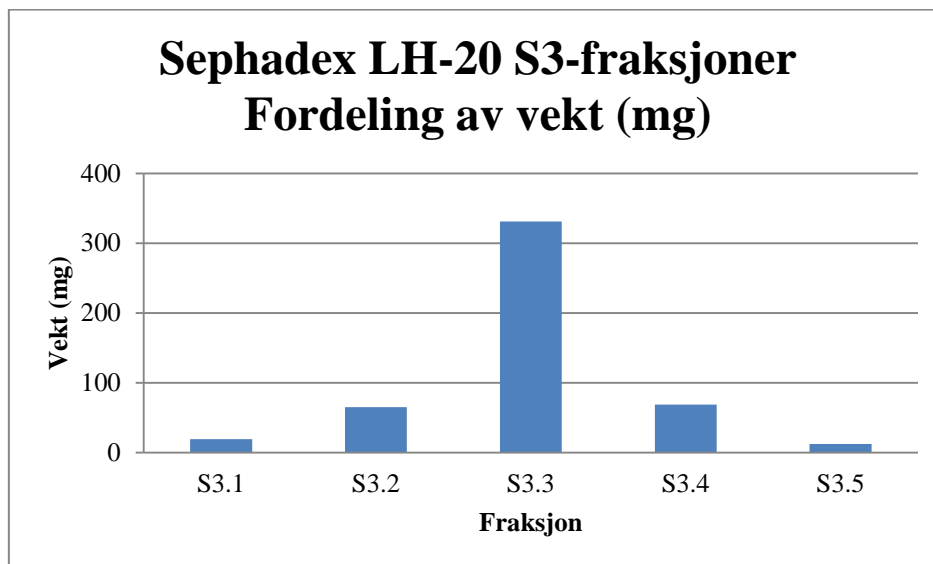
Sambunigrin var inaktiv som XO hemmer ved høyeste målte konsentrasjon. IC_{50} -verdien var langt over 1128 μM (på vektbasis $> 333 \mu g/ml$).

6.10 Separasjon av fraksjon S3

6.10.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

Fraksjon S3 ble applisert på Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble samlet 23 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til fraksjon S3.1-S3.5. Det ble applisert

463.4 mg og det totale utbyttet var 496.6 mg (107 %). Stort utbytte skyldtes trolig ftalat fra kolonnen som ble eluert ut. Fraksjon S3.3 ble eluert med 80 % vandig MeOH og utgjorde den største fraksjonen (se figur 6.21).



Figur 6.21: Utbytte av fraksjoner fra S3

6.10.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjoner og ^{13}C NMR av fraksjon S3.4. Fraksjon S3.1, S3.2 og S3.5 inneholdt trolig ftalat. Fraksjon S3.3 hadde et komplekst mønster med signaler i områder for alifatiske protoner og protoner på oksygenert karbon. Det var observert en del signaler i aromat-og olefinområdet. Fraksjon S3.4 hadde også signaler i de samme områdene som fraksjon S3.3, men fraksjon S3.4 var mindre kompleks.

6.10.3 Videre arbeid

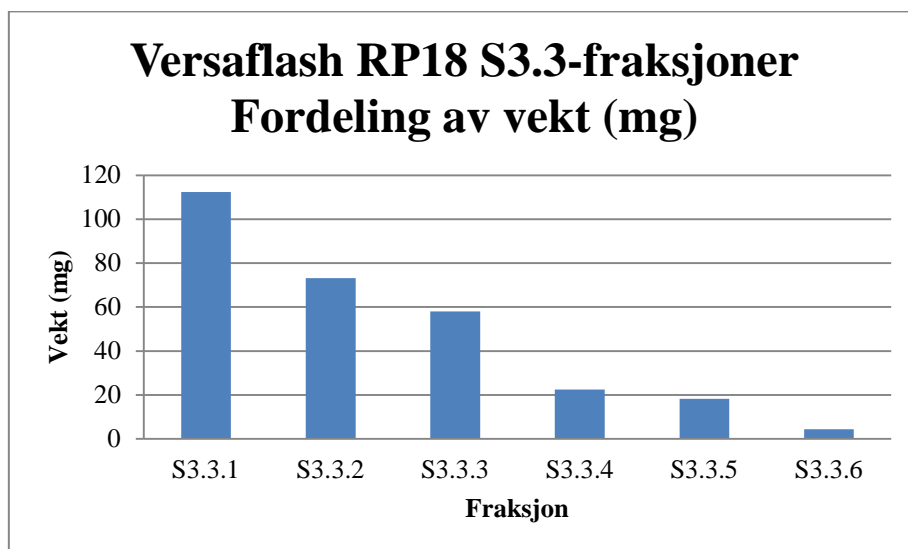
På bakgrunn av NMR-spektrene så det ut til at både fraksjon S3.3 og S3.4 var interessante. Disse fraksjonene ble valgt ut til videre opprensing.

6.11 Separasjon av fraksjon S3.3

6.11.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon S3.3 ble applisert på en omvent-fase kolonne. Det ble samlet opp 38 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 6 fraksjoner kalt S3.3.1-S3.3.6. 330.9 mg stoff ble applisert på kolonnen og det totale utbyttet var 288.7 mg (87

%). Fraksjon S3.3.1 og S3.3.2 var de største fraksjonene og vekten minket med økende fraksjonsnummer (se figur 6.22). Siden fraksjon S3.3.1 og S3.3.2 ble eluert ut med 50 % vandig MeOH, tydet det på at fraksjonene inneholdt de mest polare stoffene.



Figur 6.22: Uthytte av fraksjoner fra S3.3

6.11.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR for alle fraksjoner. Fraksjon S3.3.1, S3.3.2 og S3.3.3 hadde like spektre. Spektrene viste et signal for alifatiske protoner og noen flere signaler for protoner på oksygenert karbon. Det var også en del signaler for aromater og olefiner. Fraksjon S3.3.4, S3.3.5 og S3.3.6 var uinteressant.

6.11.3 Videre arbeid

Fraksjon S3.3.1, S3.3.2 og S3.3.3 veide mest og virket interessante utifra NMR-spektrene. Fraksjonene ble prioritert for videre arbeid. Istedenfor å bli slått sammen ble fraksjon S3.3.2 valgt ut for videre opprensing.

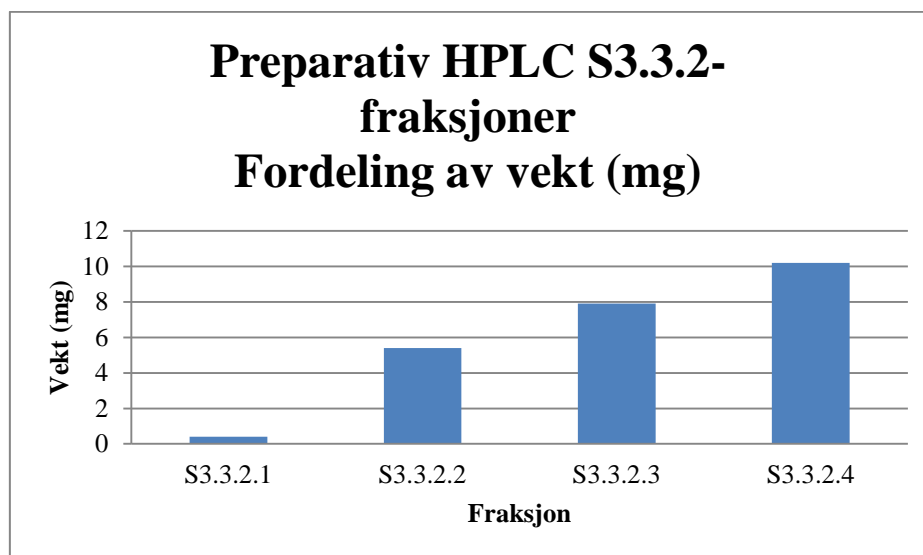
6.12 Separasjon av fraksjon S3.3.2

6.12.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.3.2 ble injisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble applisert 27 mg stoff og fraksjoner ble samlet opp avhengig av absorpsjonstopper i kromatogrammet. Ved videre

analyse i analytisk HPLC viste det seg at det var fire fraksjoner som var interessante. Disse fraksjonene ble kalt S3.3.2.1-S3.3.2.4

Det totale utbyttet var 23.9 mg (89 %). Fraksjon S3.3.2.4 veide mest av alle fraksjonene (se figur 6.23). Vekten økte med økende fraksjonsnummer.



Figur 6.23: Utbytte av fraksjoner fra S3.3.2

6.12.2 NMR-spektroskopi

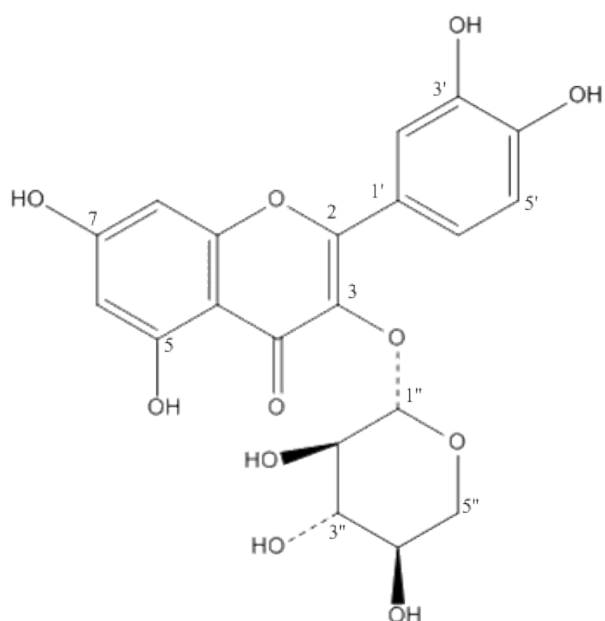
Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av ^1H NMR. Det ble også tatt ^{13}C NMR av fraksjon S3.3.2.2.

Fraksjon S3.3.2.1 ble identifisert som quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Dette stoffet var tidligere isolert fra fraksjon S3.4.1 (se avsnitt 6.15.3 og 6.15.4 for quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid og bioassay). Fraksjon S3.3.2.2 ble identifisert som quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid (se vedlegg, NMR-spekter 18-19). Identifiseringen var basert på tolkning av NMR-spektrene og ved sammenligning med litteraturdata.

Fraksjon S3.3.2.3 og S3.3.2.4 hadde mer komplekse spektr og trengte mer opprensing.

6.12.3 Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid

Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid, også kalt reynoutrin, er et flavonol glykosid (se figur 6.24). Forbindelsen er ikke blitt identifisert i *X.americana* tidligere.



Figur 6.24: Molekylstruktur av quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid
(molekylvekt 434.35g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid er gitt i tabell 6.31. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid er gitt i tabell 6.32 og 6.33.

Tabell 6.31: Tolkning av spektrene til isolert quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid

¹ H NMR*	
Signaler ved 3.06- 3.81	Protoner i sukkerdel (og i MeOH)
Dublett ved 5.18 (1H, J= 7.2)	Anomerproton (H-1'')
Dublett ved 6.21 (1H, J= 2.1)	Flavonoidstruktur. Metakoblet proton (i A-ring til quercetin) (H-6 eller H-8)
Dublett ved 6.40 (1H, J= 2.1)	Flavonoidstruktur. Metakoblet proton (i A-ring til quercetin) (H-6 eller H-8)
Dublett ved 6.85 (1H, J=8.4)	Flavonoidstruktur. Ortokoblet proton (i B-ring til quercetin) (H-5')
Dobbel dublett ved 7.58 (1H, J=2.0 og 10.2)	Flavonoidstruktur. Metakoblet og ortokoblet proton (i B-ring til quercetin) (H-6')
Signaler ved ca. 7.61 (d, J= 1.8)	Trolig metakoblet proton (i B-ring til quercetin)(H-2')
¹³ C NMR*	
Signaler ved 67.04-77.54. Ingen signal ved 60-62	Sukkerdel. Ingen signal ved 60-62 -> ingen C-6. Trolig pentose sukker

Signaler ved 94.67-99.85 og 163.07-165.98	Karboner i A-ringen
Signaler ved 115.99-149.88	Resten av karbonene i quercetin
Signal ved 104.53	Anomerkarbon (C-1'')
Signal ved 179.39	Karbonyl (C-4)

*δ-skala gitt i ppm

Tabell 6.32 : Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for quercetin-3-O-β-D-xylopyranosid (Kadota et al. 1990)

Posisjon	Observert	Litteratur
6	6.21 (d)	6.20 (d, J=2)
8	6.40 (d)	6.39 (d, J=2)
5'	6.85 (d)	6.86 (d, J=8.5)
6'	7.58	7.59 (dd, J=8.5, 2.0)
2'	7.61	7.61 (d, J=2)
3''	3.09 (dd)	3.10 (dd, J= 11, 9.0)
5''	3.39 (m)	3.41 (d, J=8.5)
	3.46 (m)	3.50 (dd, J= 8.5, 5.0)
2''	3.54 (m)	3.52 (dd, J=9.0, 7.5)
4''	3.75 (dd)	3.78 (dd, J=11, 5.0)
1''	5.18 (d)	5.16 (d, J=7.5)

Tabell 6.33: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for quercetin-3-O-β-D-xylopyranosid (Kadota et al. 1990)

Posisjon	Observert	Litteratur
8	94.67	95.55
6	99.85	100.73
10		106.39
3	135.37	136.20
9	158.41	159.20
2	158.89	159.68
5	163.07	163.81
7	165.98	166.91
4	179.39	180.14
5'	115.97	116.77
2'	117.17	117.98
1'	122.99	123.78
6'	123.26	124.06
3'	146.05	146.81

4'	149.88	150.65
5''	67.21	67.97
4''	70.99	71.75
2''	75.28	76.00
3''	77.54	78.29
1''	104.53	105.40

6.12.4 Bioassay

DPPH-test

Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.34). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC_{50} = 3.3 ± 0.1 μ g/ml eller 10.9 ± 0.3 μ M).

Tabell 6.34: DPPH-test på quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (μ g/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
1.2	20	72.9	0.9	12.7 ± 0.4 μ g/ml (29.0 ± 0.9 μ M)
0.6	10	37.9	1.8	

Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid hadde god radikalscavenger aktivitet, men noe dårligere enn quercetin. Dette er blitt vist tidligere (Kim et al. 2005). Radikalscavenger aktiviteten skyldtes trolig hydroksylgruppene på B-ringene som donerte hydrogen og et elektron til DPPH-radikalene (Heim et al. 2002). Siden quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid har et sukker bundet til seg ved 3-posisjon på C-ringene, så ble aktiviteten noe redusert i forhold til quercetin som har en OH-gruppe festet til det samme stedet.

15-LOX hemming

15-LOX hemming ble utført på quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid (se tabell 6.35). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC_{50} = 17.2 ± 0.9 μ g/ml eller 56.9 ± 3 μ M).

Tabell 6.35: 15-LOX hemming på quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (μ g/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
5	83	101.4	1.8	28.2 ± 3.1 μ g/ml (64.9 ± 7.0 μ M)
2.5	42	76.7	7.9	
1.25	21	30.4	6.8	

Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid hadde høy hemmingsaktivitet på 15-LOX, men aktiviteten var noe svakere enn quercetin. Dette er også vist tidligere i litteraturen. Hemming av lipidperoksidering skyldes at quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid fungerer som protondonor og reduserer intermediatene forårsaket av LOX (Kim et al. 2005).

XO hemming

XO hemming ble testet på quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid (se tabell 6.36). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $3.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.36: XO hemming på quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid

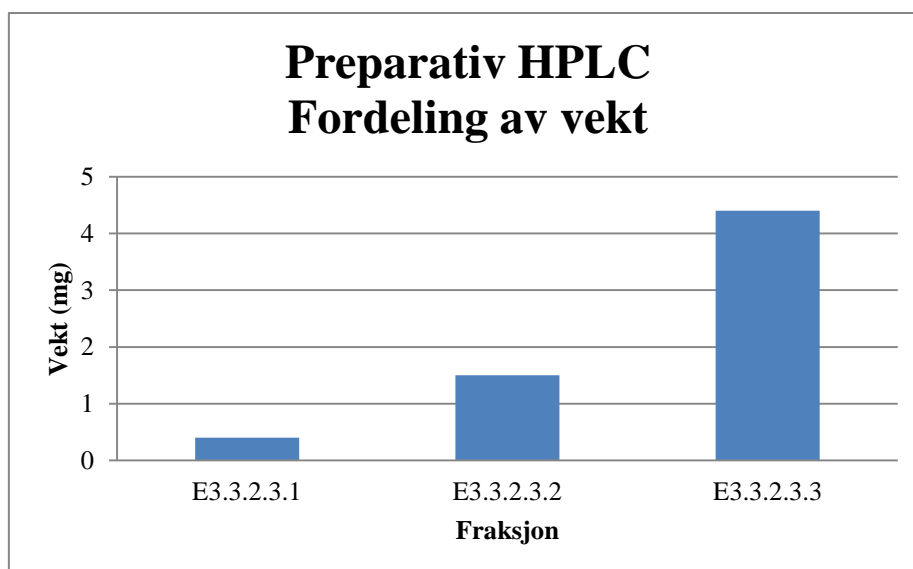
Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
10	166.7	44.7	1.7	Ca. 180 $\mu\text{g/ml}$ (ca. 414 μM)

Verdiene i tabellen viste at quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid var en dårlig hemmer av XO. Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid fikk dårlig hemmingsaktivitet selv ved høyest målte konsentrasjon. IC_{50} -verdien er estimert.

6.13 Separasjon av fraksjon S3.3.2.3

6.13.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.3.2.3 ble separert og fraksjonert på en omvendt-fase kolonne. Fraksjoner ble samlet opp basert på absorpsjonstoppene i kromatogrammet. På bakgrunn av analytisk HPLC ble fraksjonene slått sammen til tre fraksjoner (S3.3.2.3.1- S3.3.2.3.3). Det ble applisert 7.9 mg og det totale utbyttet var 6.2 mg (78 %). Fraksjon S3.3.2.3.3 veide mest av alle fraksjonene (se figur 6.25).



Figur 6.25: Utbytte av fraksjoner fra E3.3.2.3

6.13.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR for alle fraksjoner og ^{13}C NMR for fraksjon S3.3.2.3.2.

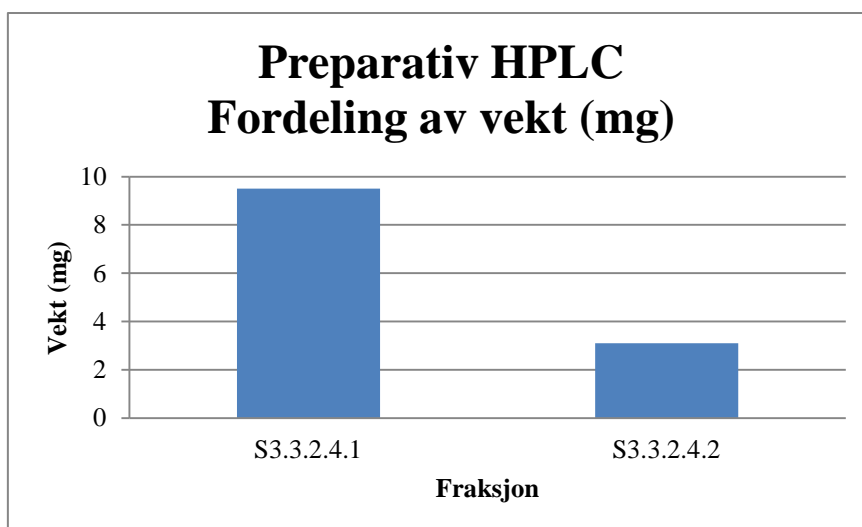
Fraksjon S3.3.2.3.1 veide lite og fikk et dårlig spekter. Fraksjon S3.3.2.3.3 hadde et uinteressant spekter.

Fraksjon S3.3.2.3.2 ble identifisert som quercetin-3-O- α -arabinofuranosid. Forbindelsen var tidligere isolert fra fraksjon S3.4.4 (se avsnitt 6.15.5 og 6.15.6 for quercetin-3-O- α -arabinofuranosid og bioassay).

6.14 Separasjon av fraksjon S3.3.2.4

6.14.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.3.2.4 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Fraksjoner ble samlet opp basert på absorpsjonstoppene i kromatogrammet. Etter analytisk HPLC ble fraksjonene slått sammen til to fraksjoner. Disse ble kalt S3.3.2.4.1 og S3.3.2.4.2. Det ble applisert 10.2 mg og det totale utbyttet var 12.6 mg (124 %). Stort utbytte kunne skyldes at kolber med inndampet stoff ikke ble helt tørre før innveiling. Fraksjon S3.3.2.4.1 veide mest av fraksjonene (se figur 6.26).



Figur 6.26: Utbytte av fraksjoner fra S3.3.2.4

6.14.2 NMR-spektroskopi

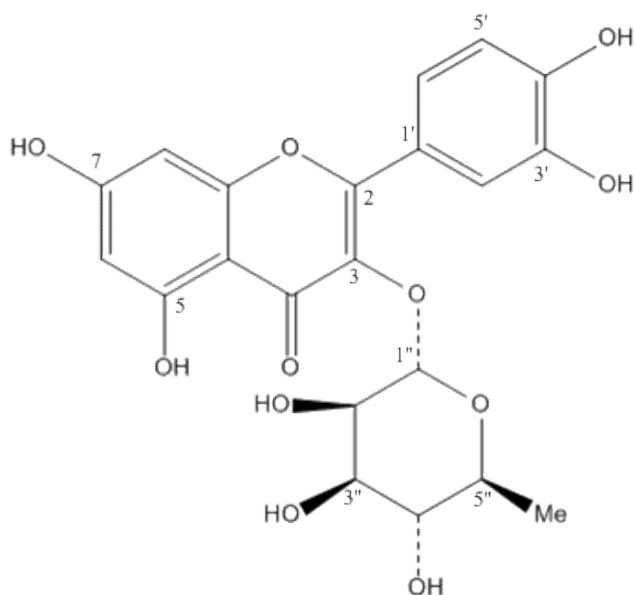
Det ble tatt ^1H NMR og ^{13}C NMR av begge fraksjonene.

Fraksjon S3.3.2.4.2 hadde urene spektre.

Fraksjon S3.3.2.4.1 ble identifisert som quercetin-3-O-rhamnopyranosid (se vedlegg, NMR-spekter 20-23). Identifiseringen var basert på tolkning av NMR-spektre, og ved sammenligning av spektrene med spektrene for en referansesubstans som forelå ved FI.

6.14.3 Quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid, også kalt quercitrin, er et flavonol glykosid (se figur 6.27). I tillegg til at quercetin-3-O-rhamnopyranosid har en nevrobeskyttende effekt, er det også rapportert andre effekter som anti-inflammatorisk, anti-nociceptiv og anti-diarroikum. Studier i diabetiske rotter har vist at forbindelsen har en positiv effekt på karbohydrat metabolisme og antioksidant status. Quercetin-3-O-rhamnopyranosid er derfor et mulig mål i behandlingen av diabetes mellitus (Babujanarthanam et al. 2009). Forbindelsen er ikke tidligere blitt isolert fra *X.americana*.



**Figur 6.27: Molekylstruktur av quercetin-3-O-rhamnopyranosid
(molekylvekt 448.38 g/mol)**

Tolkning av spektraldata for isolert quercetin-3-O-rhamnopyranosid er gitt i tabell 6.37.

Sammenligning av våre spektraldata med referansesubstansen for quercetin-3-O-rhamnopyranosid er gitt i tabell 6.38 og 6.39.

Tabell 6.37: Tolkning av spektrene til isolert quercetin-3-O-rhamnopyranosid

¹ H NMR	
Dublett ved 0.94 (J= 5.9)	Integralet gir tre protoner. Vanligvis metylgruppe i rhamnose (H-6'')
Singlett ved 1.30	Fett/ acetonrest
Singlett ved 2.16	Forurensning
Dublett ved 5.35 (J= 1.3)	Anomerproton, (H-1'')
Flavonoidstruktur av aglykonet quercetin	Se avsnitt 6.12.3 Quercetin-3-O-β-D-xylopyranosid
¹³ C NMR	
Signal ved 17.66	Metylkarbon i rhamnose (C-6'')
Signal ved 30.69	Fett/ acetonrest
Tre signaler ved 71.89-73.21	Tre sukkerkarboner
Signal ved 103.54	Anomerkarbon (C-1'')
Signaler ved 94.67-99.85, 116.36-136.11 og 146.21-165.55	Karboner på quercetin
Signal ved 180.81	Karbonyl (C-4)
COSY (viser koblingen mellom proton og proton)	

Kobling mellom protoner ved 0.94 og ca. 3.30	Kobling mellom protoner i dublett ved 0.94 og et annet signal som ligger i MeOH-toppen ved omtrent 3.30
Kobling mellom protoner ved 6.21 og 6.38	Protoner på A-ring i quercetin
Kobling mellom protoner ved 6.92 og 7.32	Protoner på B-ring i quercetin
HSQC (viser koblingen mellom hydrogen og karbon)	
Kobling mellom 0.94 og 17.66	Kobling mellom protoner ved 0.94 og karbon ved 17.66. Metyl i rhamnose
Koblinger mellom 3.35 og 72, mellom 3.74 og 72, og mellom 4.21 og 72	Koblinger mellom protoner ved 3.35, 3.74 og 4.21 med karbon ved ca. 72. Sukkerdel
Kobling mellom 6.21 og 99.79, og mellom 6.38 og 94.69	Protoner på A-ring
Koblinger mellom 6.92 og 116.36, mellom 7.30 og 122.84 og mellom 7.33 og 116.90	Protoner på B-ring
Kobling mellom 5.35 og 103.54	Anomerproton

* δ -skala er gitt i ppm

Tabell 6.38 : ^1H NMR spektraldata for quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Posisjon	Observert	Verdier for referansesubstansen
H-6''	0.94 (3H, d, J= 5.9)	0.96 (3H, d, J= 5.9)
Sukker	3.75 (1H, dd, J= 3.4, 9.6)	3.80 (1H, dd, J= 3.3, 9.1)
	4.22 (1H, dd, J= 1.7, 3.3)	4.26 (1H, dd, J= 1.3, 3.1)
H-1''	5.35 (1H, d, J= 1.3)	5.37 (1H, d, J= 1.5)
H-6	6.21 (1H, d, J= 2.1)	6.19 (1H, d, J= 2.1)
H-8	6.38 (1H, d, J= 2.1)	6.35 (1H, d, J= 2.0)
H-5'	6.92 (1H, d, J= 8.2)	6.93 (1H, d, J= 8.6)
H-2' og H-6'	7.32 (m)	7.33 (m)

Tabell 6.39: ^{13}C NMR spektraldata for quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Posisjon	Observert	Verdier for referansesubstansen
C-8	94.7	94.7
C-6	99.8	99.7
C-10		105.8
C-3	136.2	136.1
C-2		158.3
C-5		159.2
C-9		163.0
C-7		165.6

C-4	180.8	179.5
C-2'	116.3	116.3
C-5'	116.9	116.9
C-1'	122.8	122.8
C-6'		122.9
C-3'	146.4	146.2
C-4'	149.8	149.6
C-6''	17.7	17.6
C-5''	71.9	71.8
C-2''	71.9	71.95
C-3''	72.1	72.0
C-4''	73.2	73.2
C-1''	103.5	103.4

6.14.4 Bioassay

DPPH-test

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.40). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.40: DPPH-test på quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
1.2	20	85.2	1.2	$6.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ ($14.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$)
0.6	10	55.5	2.3	
0.3	5	32.2	1.8	

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid hadde god radikalscavenger aktivitet selv om molekylet hadde et rhamnose-molekyl bundet til seg. IC_{50} -verdien til quercetin-3-O-rhamnopyranosid er noe høyere enn det som står i litteraturen (Yokozawa et al. 1998). Den gode aktiviteten til quercetin-3-O-rhamnopyranosid skyldes blant annet katekolstrukturen ved 3'-og 4'-posisjonen og dobbeltbingen ved 2-og 3-posisjonen i C-ringen.

15-LOX hemming

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid ble testet på 15-LOX hemming (se tabell 6.41). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ eller $56.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$).

Tabell 6.41: 15-LOX hemming på quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
1.25	20.8	15.4	6.3	35.8± 1.7 µg/ml (79.8± 3.8 µM)
2.5	41.7	59.7	2.2	

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid hadde en god hemming på 15-LOX, men hemmingsaktiviteten var lavere enn for quercetin.

XO hemming

Quercetin-3-O-rhamnopyranosid ble testet for XO hemming (se tabell 6.42). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (1.0± 0.1 µg/ml eller 3.3± 0.3 µM).

Tabell 6.42: XO hemming på quercetin-3-O-rhamnopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
5	83.3	84.6	0.3	37±2 µg/ml (83.0± 4.5 µM)
2.5	41.7	58.2	2.9	
1.25	20.8	10.8	3.4	

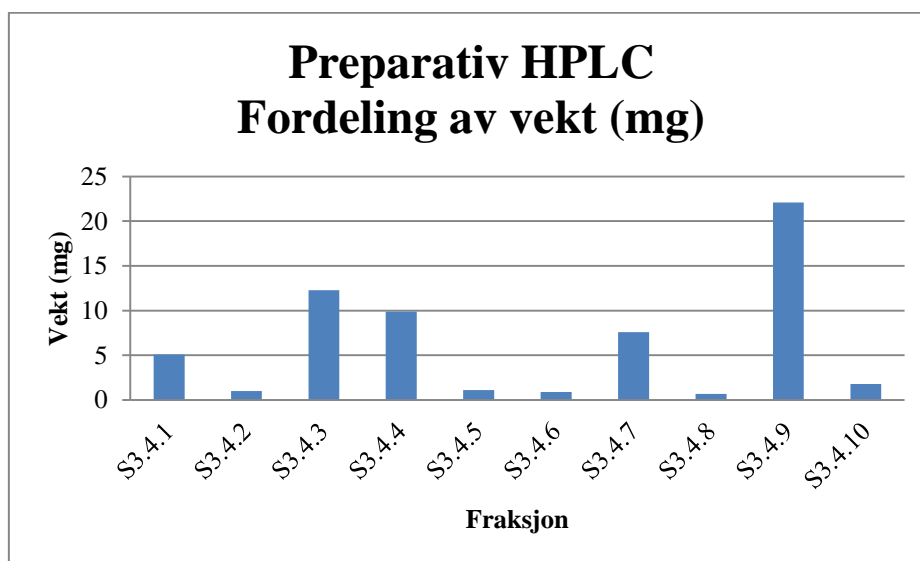
Quercetin-3-O-rhamnopyranosid hadde moderat hemmingsaktivitet på XO, men betydelig sterkere enn quercetin-3-O-β-D-xylopyranosid. Sannsynligvis har sukkerdelen mye å si for den lave hemmingsaktiviteten på XO.

6.15 Separasjon av fraksjon S3.4

6.15.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4 på 68.8 mg ble applisert på en omvendt-fase kolonne, og kolonnefraksjoner ble samlet opp på bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet. Kolonnefraksjonene ble videre analysert ved analytisk HPLC og ble slått sammen til ti fraksjoner. Disse fraksjonene ble kalt S3.4.1-S3.4.10.

Det totale utbyttet var 62,5 mg (91 %). Tapt stoff kunne skyldes at stoffer ble sittende i kolonnen. Fraksjon S3.4.3, S3.4.4 og S3.4.9 var de største fraksjonene (se figur 6.28).



Figur 6.28: Utbytte av fraksjoner fra S3.4

6.15.2 NMR-spektroskopi

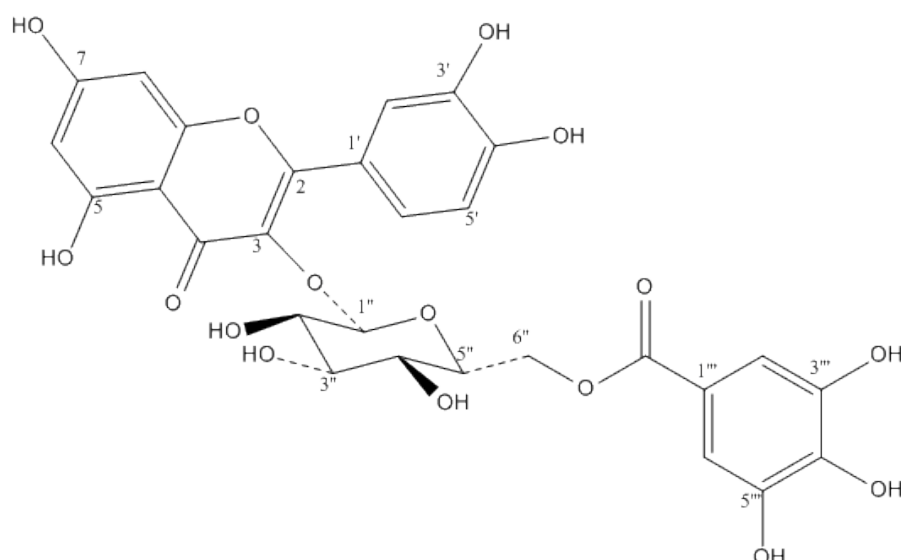
Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjoner og ^{13}C NMR av fraksjon S3.4.1, S3.4.4 og S3.4.7.

Fraksjon S3.4.1 og S3.4.7 ble identifisert som quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (se vedlegg, NMR-spekter 24-25). Det ble også isolert quercetin-3-O- α -arabinofuranosid fra fraksjon S3.4.4 (se vedlegg, NMR-spekter 26-27). Identifiseringene var basert på tolkning av spektrene og ved søk i SciFinder etter struktur og spektraldata.

Fraksjon S3.4.3 og S3.4.9 hadde komplekse spektre og det var nødvendig med opprensing. Resten av fraksjonene hadde ikke interessante spektre.

6.15.3 Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (tellimosid) er et flavonolglykosid (se figur 6.29). Det er vist at forbindelsen har antifungal aktivitet (De-Leo et al. 2004). Forbindelsen er ikke blitt isolert fra *X.americana* tidligere.



Figur 6.29: Molekylstruktur av quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid
(molekylvekt 616.48 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid er gitt i tabell 6.43. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid er gitt i tabell 6.44 og 6.45.

Tabell 6.43: Tolkning av spektrene til isolert quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

¹ H NMR	
Signaler ved 3.45-3.48	Sukker (H-2'' – H-5'')
Dublett ved 5.21 (1H, J=7.2)	Anomerproton (H-1'')
Flavonoidstruktur av aglykonet quercetin	Se avsnitt 6.12.3 Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid
Singlett 6.93 (2H)	Integral gir to protoner. Identiske protoner på galloylgruppe (H-2''' og H-6''')
¹³ C NMR	
Signal ved 64.32	C-6'' på sukker. Deshildet på grunn av galloylgruppen
Signaler ved 71.47-80.96	Sukker
Signaler ved 94.83-99.92, 115.92-135.29 og 146.27-165.88	Karboner på quercetin
Signal ved 104.2	Anomerkarbon (C-1'')
Signal ved 179.37	Karbonyl (C-4)

* δ -skala er gitt i ppm

Tabell 6.44 : Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (Masuda et al. 2001)

Posisjon	Observert	Litteratur
6	6.18 (d, J= 2.1)	6.16 (d, J=2.0)
8	6.34 (d, J= 2.1)	6.32 (d, J=2.0)
5'	6.72 (d, J= 8.6)	6.70 (d, J=8.0)
2'	7.53	7.50
6'	7.56	7.54 (dd, J=8.0, 1.5)
2'', 3'', 4'' og 5''	3.45-3.48	3.40-3.54
6''	4.25 (dd, J= 1.9, 12.7) 4.31 (dd, J= 4.7, 11.8)	4.25 (dd, J= 2.0, 12.0) 4.33 (dd, J= 5.0, 12.0)
1''	5.21 (d, J= 7.2)	5.20 (d, J=7.5)
2''' og 6'''	6.93 (s)	6.93 (s)

Tabell 6.45: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (Masuda et al. 2001)

Posisjon	Observert	Litteratur
8	94.8	94.9
6	99.9	100
10	105.6	105.4
3	135.3	135.3
9	158.3	158.4
2	159.4	159.3
5	162.9	161.6
7	165.9	165.8
4	179.4	179.3
5'	115.9	115.7
2'	117.2	117.2
1'	123	123
6'	123.5	123.5
3'	145.8	145.8
4'	149.7	149.7
6''	64.3	64.3
4''	71.5	71.4
2''	75.7	75.7
5''	75.9	75.8
3''	78	78
1''	104.2	104.3

CO ved 6''	168.2	168.2
2''', 6'''	110.1	110.1
1'''	121.2	121.2
4'''		139.7
3''', 4'''	146.3	146.5

6.15.4 Bioassay

DPPH-test

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid ble testet for radikalscavenging aktivitet (se tabell 6.46). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.46 : DPPH-test på quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
0.6	10	69.2	3.5	$6.7 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ ($10.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$)
0.3	5	35.4	1.1	

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid var en god radikalscavenger. Forbindelsen hadde litt dårligere IC_{50} -verdi enn quercetin på vektbasis, men på molarbasis var IC_{50} -verdiene like. Selv om quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid hadde et glukosid ved 3-posisjon i C-ringen som kunne redusere hemmingsaktiviteten, så hadde molekylet også en galloylgruppe som kunne forsterke radikalscavenger aktiviteten (Masuda et al. 2001). Dette forklarer den gode hemmingsaktiviteten til quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid.

15-LOX hemming

Det ble utført 15-LOX hemming på quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (se tabell 6.47). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC_{50} = 17.2 ± 0.9 μ g/ml eller 56.9 ± 3.0 μ M).

Tabell 6.47: 15-LOX hemming på quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (μ g/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
5	83	90.2	3.6	35.4 ± 2.9 μ g/ml (57.4 ± 4.7 μ M)
2.5	42	61.2	6.2	
1.25	21	15.7	2.9	

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid hadde god hemmingseffekt på 15-LOX hemming. På vektbasis hadde forbindelsen lavere hemmingsaktivitet enn quercetin, men på molarbasis hemmet forbindelsene enzymet like sterkt. Galloylgruppen i quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid bidro trolig til den gode hemmingsaktiviteten av 15-LOX.

XO hemming

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid ble testet ved XO hemming (se tabell 6.48). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC_{50} = 1.0 ± 0.1 μ g/ml eller 3.3 ± 0.3 μ M)

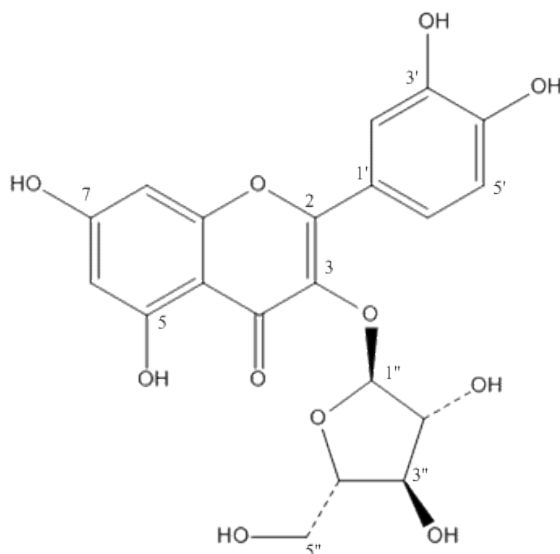
Tabell 6.48: XO hemming på quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (μ g/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
10	167	16.6	3.6	> 333 μ g/ml (> 540 μ M)

Quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon. Dette tydet på at flavonoider med sukker bundet til seg har dårlig hemmingsaktivitet på XO. Selv om quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid hadde en galloylgruppe på seg så ble ikke hemmingen av XO forsterket.

6.15.5 Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid

Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid, også kalt avicularin, er et flavonol glykosid. Forbindelsen er blitt funnet tidligere i flere planter, men dette er første gangen forbindelsen er isolert fra *X.americana*.



Figur 6.30: Molekylstruktur av quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (molekylvekt: 434.35 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert quercetin-3-O- α -arabinofuranosid er gitt i tabell 6.49. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for quercetin-3-O- α -arabinofuranosid er gitt i tabell 6.50 og 6.51.

Tabell 6.49: Tolkning av spektrene til isolert quercetin-3-O- α -arabinofuranosid

¹ H NMR	
Signaler ved 3.50-4.35	Sukker (H-2'' – H-5'')
Bred singlett ved 5.47 (1H)	Anomerproton (H-1'')
Flavonoidstruktur av aglykonet quercetin	Se avsnitt 6.12.3 Quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid
¹³ C NMR	
Signal ved 62.52	C-5'' på sukker
Signaler ved 78.67-87.98	Sukker. Totalt 5 signaler for sukker, det er en pentose
Signal ved 105.61	Anomerkarbon (C-1'')
Signaler ved 94.75-99.85 og 116.42-165.98	Karboner på quercetin

* δ -skala gitt i ppm

Tabell 6.50 : Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (Pistelli et al. 1993)

Posisjon	Observert	Litteratur
Pentose	3.50-4.35	3.40-4.24 (5H, m)
8	6.21 (d, J= 2.0)	6.10 (1H, d, J=2.1)
6	6.39 (d, J= 2.0)	6.28 (1H, d, J=2.1)
5'	6.91 (d, J= 8.3)	6.79 (1H, d, J=8.2)
6'	7.49 (dd, J= 2.2, 8.4)	7.47 (1H, dd, J=2.0, 8.5)
2'	7.53 (d, J= 2.1)	7.65 (1H, d, J=2.0)
1''	5.47 (s)	5.36 (1H, d, J=0.9)

Tabell 6.51: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (Pistelli et al. 1993)

Posisjon	Observert	Litteratur
8	94.8	94.7
6	99.9	99.8
10	105.6	105.6
3	134.9	134.9
2	158.5	158.5
9	159.3	159.3
5	163.0	163.0
7	166	165.9
4	179.9	179.9
2'	116.4	116.4
5'	116.8	116.8
1'	123	123
6'	123.1	123.1
3'	146.3	146.3
4'	149.8	149.8
5''	62.5	62.5
3''	78.7	78.6
2''	83.3	83.3
4''	88	87.9
1''	109.5	109.5

6.15.6 Bioassay

DPPH-test

Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid ble testet for radikalscavenging aktivitet (se tabell 6.52).

Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$).

Tabell 6.52: DPPH-test på quercetin-3-O- α -arabinofuranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
1.2	20	86.4	0.7	$8.8 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ ($20.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$)
0.6	10	54.9	2.2	
0.3	5	29.4	0.4	

Verdiene i tabellen viste at quercetin-3-O- α -arabinofuranosid hadde god radikalscavenging aktivitet. Forbindelsen var en noe dårligere scavenger enn quercetin fordi den har et furanosemolekyl bundet til seg.

15-LOX hemming

15-LOX hemming ble utført på quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (se tabell 6.53). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 17.2 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ eller $56.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$).

Tabell 6.53: 15-LOX hemming på quercetin-3-O- α -arabinofuranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
2.5	42	65.7	5	$33.4 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$ ($76.9 \pm 6.4 \mu\text{M}$)
1.25	21	16.4	8	

Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid var en relativt god hemmer av 15-LOX, men forbindelsen hadde lavere hemmingsaktivitet enn quercetin.

XO hemming

XO hemming ble utført på quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (se tabell 6.54). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $3.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.54: XO hemming på quercetin-3-O- α -arabinofuranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (μ g/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
20	333.3	92.9	1	180 \pm 2 μ g/ml (414 \pm 5 μ M)
10	166.7	44.5	0.5	

Quercetin-3-O- α -arabinofuranosid hadde en IC₅₀-verdi på 414 μ M (på vektbasis 180 μ g/ml).

Dette viste at forbindelsen hadde en mye lavere hemmingsaktivitet enn quercetin.

6.16 Separasjon av fraksjon S3.4.3

6.16.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Fraksjoner ble samlet opp basert på absorpsjonstoppene i kromatogrammet. Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC, og det ble valgt ut én fraksjon for videre opprensing. Fraksjonen ble kalt S3.4.3.1.

Det ble applisert 12.3 mg på kolonnen og det totale utbyttet var 10.5 mg (85 %).

6.16.2 NMR-spektroskopi

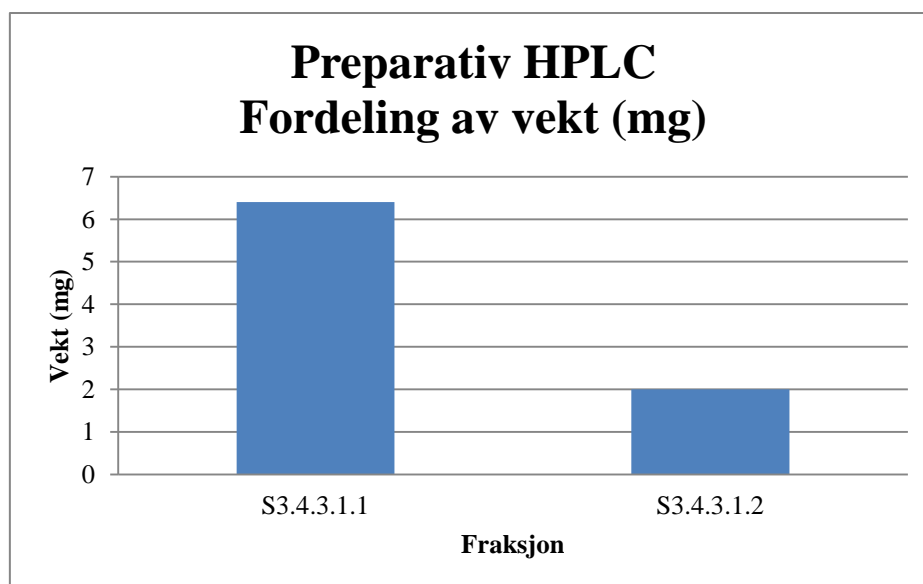
Fraksjon S3.4.3.1 hadde et urent ¹H NMR-spekter og det var nødvendig med videre opprensing.

6.17 Separasjon av fraksjon S3.4.3.1

6.17.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.3.1 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Fraksjoner ble samlet opp basert på absorpsjonstoppene i kromatogrammet. Ved analyse på analytisk HPLC ble det valgt ut to fraksjoner som virket interessante. Fraksjonene ble kalt S3.4.3.1.1 og S3.4.3.1.2.

Det ble applisert 10.5 mg på kolonnen og det totale utbyttet var 8.4 mg (80 %). Fraksjon S3.4.3.1.1 utgjorde den største fraksjonen (se figur 6.31).



Figur 6.31: Utbytte av fraksjoner fra S3.4.3.1

6.17.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon S3.4.3.1.1 og S3.4.3.1.2 hadde ganske like ^1H NMR-spektre, men fraksjon S3.4.3.1.1 hadde et mer urent spekter.

Fraksjon S3.4.3.1.2 ble identifisert som kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Identifiseringen var basert på tolkning av spektrene og ved sammenligning med litteratordata. Siden fraksjonen inneholdt lite stoff fikk fraksjonen et dårlig ^{13}C NMR-spekter. Derfor ble fraksjon S3.4.3.1.1, som sannsynlig inneholdt samme stoff, renset opp for å skaffe nok mengde stoff til å gi et bedre ^{13}C NMR-spekter.

6.18 Separasjon av fraksjon 3.4.3.1.1 og underfraksjonene

6.18.1 Preparativ HPLC og NMR-spektroskopi

For å kunne få tak i nok stoff av kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid ble fraksjon S3.4.3.1.1 renset opp med preparativ HPLC. Dette ga fraksjon S3.4.3.1.1.1 (2.7 mg) og S3.4.3.1.1.2 (1 mg). Fraksjonene ble deretter analysert ved hjelp av ^1H NMR. Spektrene viste at fraksjon S3.4.3.1.1.2 inneholdt kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid.

Fraksjon S3.4.3.1.1.1 ble renset videre med preparativ HPLC. Det var kun én fraksjon som var interessant og fraksjonen ble kalt S3.4.3.1.1.1.1 (1.9 mg). Det ble tatt NMR-spektroskopi

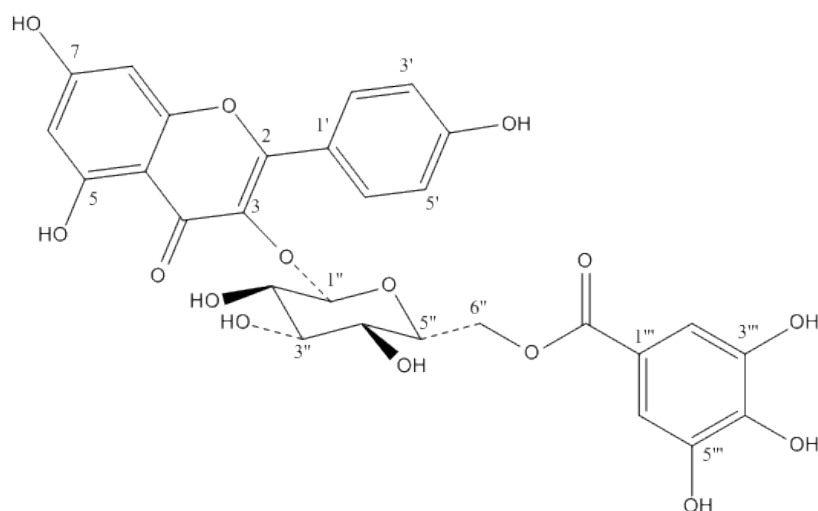
av fraksjonen. ^1H NMR-spektret viste at fraksjonen inneholdt kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid.

Fraksjoner som ble identifisert som kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid (S3.4.3.1.2, S3.4.3.1.1.2. og S3.4.3.1.1.1.1) ble slått sammen. Det ble tatt ^1H NMR og ^{13}C NMR av disse fraksjonene (se vedlegg, NMR-spekter 28-29).

6.18.2 Kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid

Kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid er et flavonolglykosid (se figur 6.32).

Forbindelsen har vist antifungal aktivitet mot en klinisk isolert stamme av *Candida albicans* (De-Leo et al. 2004). Forbindelsen er ikke blitt funnet i *X.americana* tidligere.



Figur 6.32: Molekylstruktur av kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid
(molekylvekt: 600.48 g/ml)

Tolkning av spektraldata for isolert kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid er gitt i tabell 6.55. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid er gitt i tabell 6.56 og 6.57.

Tabell 6.55: Tolkning av spektrene til isolert kaempferol-3-O- β -D-(6'')-galloyl)-glukopyranosid

^1H NMR*	
Singlett ved 0.90	Fett
Bred singlett ved 5.20 (1H)	Anomerproton (H-1'')

Brede singletter ved 6.19 og 6.35	Flavonoidstruktur. Integral gir et proton hver. Protoner på A-ring (H-6 og H-8)
Dublett ved 6.73 (J= 8.5)	Integral gir to protoner. To identiske protoner på B-ring (H-2' og H-6' eller H-3' og H-5')
Dublett ved 7.93 (J= 8.3)	Integral gir to protoner. To identiske protoner på B-ring. Ortokoblet mønster ved 6.73 og 7.93 gir kaempferol (H-2' og H-6' eller H-3' og H-5')
Singlett ved 6.94 (2H)	Protoner på galloylgruppe (H-2''' og H-6''')
¹³ C APT NMR*	
Signal ved 64.25	C-6'' i sukker
Signaler ved 94.97	Karbon på A-ring i kaempferol
Signal ved 104.40	Anomerkarbon (C-1'')
Signaler ved 116.04 og 132.23	Karboner på B-ring i kaempferol
Signal ved 146.41	Oksygenert aromatisk karbon

*δ-skala gitt i ppm

Tabell 6.56: Sammenligning av observerte ¹H NMR data med data for kaempferol-3-O-β-D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (Masuda et al. 2001)

Posisjon	Observert	Litteratur
6	6.19	6.14
8	6.35	6.30
3', og 5'	6.73 (d, J= 8.5)	6.68 (d, J= 8.0)
2' og 6'	7.93 (d, J= 8.3)	7.88 (d, J= 8.0)
2'', 3'', 4'' og 5''	3.35-3.46	3.40-3.48
6''	4.28	4.24 (m)
1''	5.20 (s)	5.16 (d, J= 7.5)
2''' og 6'''	6.94 (s)	6.92 (s)

Tabell 6.57: Sammenligning av observerte ¹³C NMR data med data for kaempferol-3-O-β-D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (Masuda et al. 2001)

Posisjon	Observert	Litteratur
8	94.97	94.9
6		100.0
10	104.40	105.7
3		135.2
2		158.4
9		159.5
5		162.8

7		166.0
4		179.3
3' og 5'	116.04	116.0
1'		122.6
2' og 6'	132.23	132.2
4'		161.4
6''	64.25	64.2
4''	71.47	71.3
2'' og 5''	75.86	75.7
3''		78.0
1''	104.40	104.4
2''' og 6'''	110.18	110.1
1'''	121.33	121.2
4'''		139.7
3''' og 4'''	146.41	146.3
CO ved 6''		168.1

6.18.3 Bioassay

DPPH-test

Kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid ble testet for radikalscavenging aktivitet (se tabell 6.58). Det var ikke nok stoff til å gjennomføre 15-LOX hemming og XO hemming. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ eller $10.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.58: DPPH-test på kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50}
4.8	80	87.7	3.9	$33 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ($55 \pm 3 \mu\text{M}$)
1.2	20	29.3	0.3	

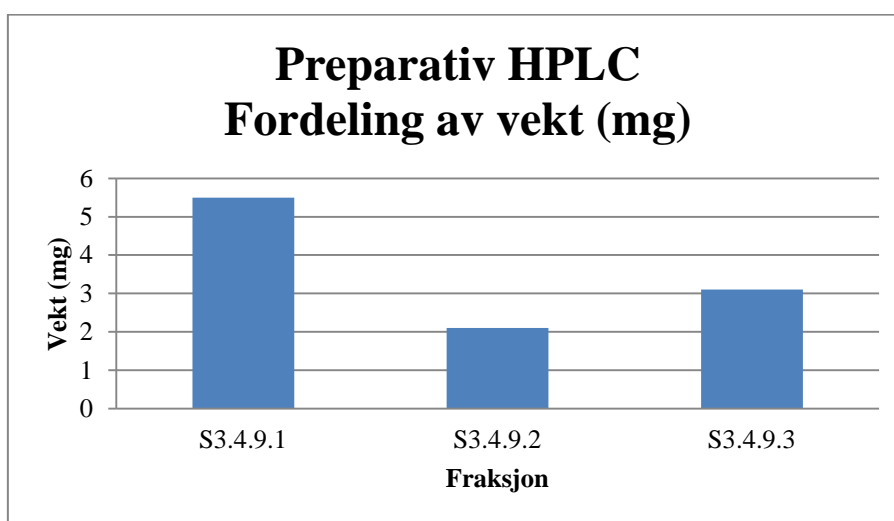
Kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid hadde radikalscavenging aktivitet. Aktiviteten var mye lavere enn quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Forskjellen på aktivitet skyldes at kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid har en færre hydroksylgruppe i B-ringen. Hydroksylgrupper som står i ortoposisjon i B-ringen har mye å si for radikalscavenging aktiviteten. Funnene stemmer godt med litteraturen (Masuda et al. 2001).

6.19 Separasjon av fraksjon S3.4.9

6.19.1 Preparativ HPLC

Fraksjon S3.4.9 på 22.1 mg ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Kolonnefraksjoner ble samlet opp basert på absorpsjonstoppene i kromatogrammet. Ved analytisk HPLC ble det valgt ut tre fraksjoner som så interessante ut og disse ble kalt S3.4.9.1-S3.4.9.3 (se figur 6.33).

Det totale utbyttet var 10.7 mg (48%). Tap av stoff skyldtes at noen kolonnefraksjoner fra preparativ HPLC ikke ble dampet inn.



Figur 6.33: Utbytte av fraksjoner fra S3.4.9

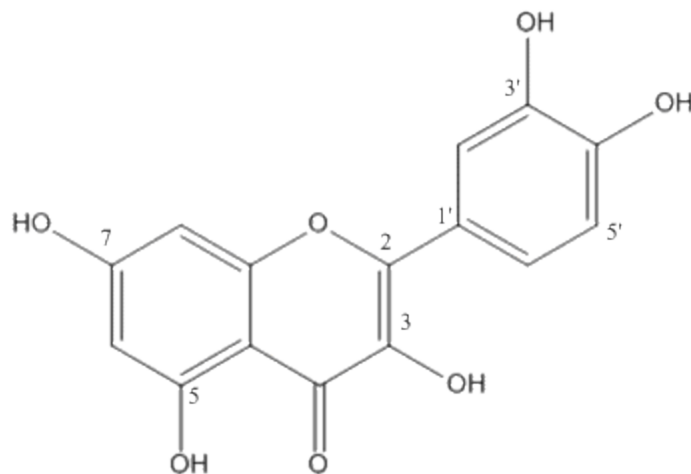
6.19.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR. Fraksjon S3.4.9.1 og S3.4.9.3 ble også analysert ved hjelp av ^{13}C NMR.

Fraksjon S3.4.9.1 og S3.4.9.2 ble identifisert som quercetin-3-O- α -arabinofuranosid. Spektrene til disse fraksjonene ble sammenlignet med spektrene til tidligere isolerte fraksjoner (se avsnitt 6.15.5 og 6.15.6 for quercetin-3-O- α -arabinofuranosid og bioassay). Fraksjon S3.4.9.3 ble identifisert som quercetin (se vedlegg, NMR-spektre 30-31). Identifiseringen var basert på tolkning av spektrene og ved sammenligning av spektrene med litteraturdata.

6.19.3 Quercetin

Quercetin er et flavonoid av typen flavonol (se figur 6.34). Forbindelsen er rapportert til å ha antioksidativ-, anticancer-, antimikrobiell- og antiviral aktivitet. Quercetin har ikke blitt funnet i *X.americana* tidligere.



Figur 6.34: Molekylstruktur av quercetin (molekylvekt 302.24 g/mol)

Tolkning av spektraldata for isolert quercetin er gitt i tabell 6.59. Sammenligning av våre spektraldata med referansedata for quercetin er gitt i tabell 6.60 og 6.61.

Tabell 6.59: Tolkning av spektrene til isolert quercetin

¹ H NMR	
Dublett ved 6.19 (J= 2.1)	Metakoblet proton på A-ring i quercetin (H-6 eller H-8)
Dublett ved 6.40 (J= 2.0)	Metakoblet proton på A-ring i quercetin (H-6 eller H-8)
Dublett ved 6.89 (J= 8.5)	Ortokoblet proton på B-ring (H-5')
Dobbel dublett ved 7.63 (J= 2.1 og 8.5)	Orto og metakoblet proton i B-ring (H-6')
Dublett ved 7.74 (J= 2.1)	Metakoblet proton i B-ring (H-2')
¹³ C NMR	
Signaler ved 94.40-99.23 og 162.50-165.55	Karboner på A-ringen til quercetin
Signaler ved 115.99-148.76	Karboner på B-ringen til quercetin
Signalet ved 177.33	Karbonyl (C-4)
Signaler ved 104.51, 148.01, 158.22, 177.32	Resten av karboner til quercetin

Tabell 6.60: Sammenligning av observerte ^1H NMR data med data for quercetin (Hasan et al. 2010)

Posisjon	Observert	Litteraturdata
6	6.19 (d, J= 2.1)	6.25 (1H, d, J=2)
8	6.40 (d, J= 2.0)	6.43 (1H, d, J=2)
5'	6.89 (d, J=8.5)	6.89 (1H, d, J=8.5)
6'	7.63 (dd, J= 8.5, 2.1)	7.65 (1H, dd, J=8.5, 2.5)
2'	7.74 (d, J=2.1)	7.74 (1H, dd, J=8.5, 2.5)

Litteraturdata for H-2' er trolig trykkfeil.

Tabell 6.61: Sammenligning av observerte ^{13}C NMR data med data for quercetin (Hasan et al. 2010)

Posisjon	Observert	Litteraturdata
8	94.40	94.5
6	99.23	99.3
10	104.51	104.1
3		137.2
2	148.01	148
9	158.22	158.1
5	162.50	161.1
7	165.55	165.3
4	177.33	177.4
2'	115.99	116.0
5'	116.22	116.2
6'	121.67	121.6
1'	124.13	124.1
4'	146.21	146.2
3'	148.76	148.6

6.19.4 Bioassay

DPPH-test

Kommersiell quercetin ble testet for radikalscavenging (se tabell 6.62). Ingen positiv kontroll ble benyttet fordi quercetin i seg selv er en positiv kontroll.

Tabell 6.62: DPPH-test på quercetin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
0.378	6.28	83.4	3.5	3.3± 0.1 µg/ml (10.9± 0.3 µM)
0.189	3.14	47.9	0.7	

Quercetin er en god radikalscavenger. Molekylstrukturen til quercetin består av to ortokoblede hydroksylgrupper i B-ringene og en fri hydroksylgruppe ved C-3 i C-ringene. Disse egenskapene gjør at quercetin er en god radikalscavenger. IC₅₀-verdien til quercetin stemmer relativt godt med litteraturen (Yokozawa et al. 1998).

15-LOX hemming

Quercetin ble testet ved 15-LOX hemming (se tabell 6.63).

Tabell 6.63: 15-LOX hemming på quercetin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
2.5	42	101.1	0.1	17.2± 0.9 µg/ml (56.9± 3.0 µM)
1.25	21	61.6	3.7	
0.625	10	19.1	0.8	

Quercetin hadde en IC₅₀-verdi på 56.9 µM (på vektbasis 17.2 µg/ml). IC₅₀-verdien er litt lavere enn det som står i litteraturen (Malterud og Rydland 2000). Dette er observert tidligere også, og synes å ha sammenheng med bytte av instrument.

XO hemming

Quercetin ble testet ved XO hemming (se tabell 6.64).

Tabell 6.64: XO hemming på quercetin

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀
0.158	2.6	92.7	0.3	1.0± 0.1 µg/ml (3.3± 0.3 µM)
0.078	1.3	76.5	3.2	
0.039	0.7	23	10.8	

Quercetin hadde en IC_{50} -verdi på $3.3 \mu M$ (på vektbasis $1.0 \mu g/ml$). Dette stemmer godt overens med det som er oppgitt i litteraturen (Chen et al. 2009).

Del II

Etnofarmakologiske studier i Mali

7 Etnofarmakologiske studier i Mali

7.1 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi som et forskningsfelt har relativt kort historie. Uttrykket ble for første gang brukt i 1967 som tittelen på en bok om hallusinogener. I dag er feltet definert som et ”tverrfaglig vitenskapelig studium av biologisk aktive forbindelser som tradisjonelt har vært benyttet eller kjent av mennesker til behandling av sykdom” (Heinrich 2003). Med eksperter fra ulike fagfelt blir det mulig å observere, identifisere, beskrive og eksperimentere innfødte legemidler og deres biologiske aktiviteter (Heinrich og Gibbons 2001). Kompetanse fra ulike fagfelt er viktig for å gi gode resultater på forskningen av medisplanter. Et forskningsteam kan bestå av antropologer, botanikere, farmakognoster, farmakologer og kjemikere (Edwards et al. 2005).

Etnofarmakologi har bidratt til oppdagelsen av mange viktige planteavlede legemidler. Ved midten av det 19.århundre var minst 80% av alle medisiner avledet fra planter. Aspirin, atropin, digoxin, kinin og vinkristin er noen få eksempler på hva medisplanter har gitt oss. De fleste ble opprinnelig oppdaget gjennom studier av tradisjonelle kurer og kunnskap hos innfødte (Gilani og Rahman 2005).

Etnofarmakologisk forskning og annen forskning som involverer bruken av biologiske kilder i et land, er i dag basert på enighet og tillatelser bestående av internasjonale og bilaterale avtaler. Den viktigste avtalen er ”Konvensjon om biologisk mangfold”, som ser på rettigheter og oppdrag assosiert med biologisk mangfold på et internasjonalt nivå. En viktig del av forskningen er å ivareta behov og interesser til befolkningen som forskningsteamet samarbeider med (Heinrich og Gibbons 2001).

7.2 Mali

Mali ligger i Vest-Afrika og grenser til Algerie, Niger, Senegal, Mauritania, Burkina Faso, Elfenbenskysten og Guinea (se figur 7.1). Hovedstaden i Mali heter Bamako. Landet har tre klimatiske områder: den nordlige delen er en del av Sahara-ørkenen. Her krysser nomader med sine flokker. Det sentrale området består av Sahel som er relativt tørt, såkalt halvørken. Den sørlige delen av landet består av fuktig savanneklima (Africa-Ciel 2011). Det er i sør

størsteparten av befolkningen befinner seg, sammen med landets to viktigste elver, Senegal og Niger (Wikipedia 2011).

Mali er et av verdens fattigste land og er fortsatt avhengig av utenlandsk bistand. I 2009 fikk Mali 78,9 millioner kroner i bistand fra Norge (NORAD 2011). Om lag 10% av befolkningen er nomader og 80% av befolkningen er sysselsatt i jordbruk og fiske. Befolkningstallet i Mali er estimert til nesten 14,2 millioner i juli 2011. Landets befolkning er sammensatt av flere stammer av ulike etniske grupper. Alle har hvert sitt språk og egne tradisjoner. Den største stammen er Mande, som inkluderer Bambara, Malinké og Soninké. Det offisielle språket i landet er fransk og hovedreligionen er islam (CIA 2011).



Figur 7.1: Kart over Mali

7.3 Helse og tradisjonell medisin i Mali

De største helseproblemene i Mali skyldes hovedsakelig infeksjøs sykdommer som malaria, schistosomiasis og innvollsormer. For å forbedre helsetilstanden bruker folket både konvensjonell og tradisjonell medisin. Konvensjonell medisin kan bli dyr for befolkningen og er ikke alltid tilgjengelig utenfor de store byene. Dette medfører at 80% av befolkningen fortsatt bruker tradisjonell medisin (Diallo 2010). Tradisjonell medisin utgjør et omfattende kunnskapssystem. Kunnskapen blir overført fra generasjon til generasjon i muntlig eller skriftlig form for å diagnostisere, forebygge eller eliminere en fysisk, mental, sosial eller åndelig ubalanse (Diallo og Paulsen 2010). I Mali er det én tradisjonell healer (heretter omtalt som healer) per 500 mennesker, sammenlignet med én lege per 10 000 mennesker (Diallo 2010).

”The Department of Traditional Medicine” (DMT) er et samarbeidssenter hvor forskning på tradisjonell medisin foregår. Samarbeidet ble utarbeidet av regjeringen i Mali og World Health Organization (WHO). I tråd med WHO’s retningslinjer er et av hovedmålene til DMT å etablere en mekanisme for å sikre at tradisjonell medisin utfyller konvensjonell medisin. Dette forutsetter at medisiner kan bli produsert fra lokale ressurser, spesielt fra medisinplanter. For å nå målene foretok DMT et antall aktiviteter som registrering av healere og deres medisinske planter, og forskning og utvikling vedrørende ”improved traditional medicines” (ITM). Nord-sør samarbeid fant sted i form av opplæring av forskere som kunne fullføre sine doktorgradsavhandlinger. På den ene siden har flere forskere fått opplæring ved universitetene i Oslo, Marseille, Toulouse, Lausanne og Messina, på den andre siden har Mali fått studenter fra nord som utfører feltarbeid i Mali (Diallo og Paulsen 2010).

DMT har registrert åtte ITM (se figur 7.2), den niende er på vei. ITM er tradisjonelle plantepreparater som er blitt forbedret og som viser effekt både i mennesker og i *in vitro* bioassays. ITM er blitt undersøkt for fravær av toksisitet i dyrestudier. Disse produktene finnes nå i apoteker i Mali og er oppfattet som essensielle medisiner (UIO 2011):

- Balembo, hostesirup for barn og voksne. Sirupen er laget av bær fra *Crossopteryx febrifuga*
- Dysenterial, mot dysenteri og forstoppelse. Overjordisk del av *Euphorbia hirta* blir brukt

- Gastrosedal, mot magesår og gastritt. Består av tørket pulveriserte røtter av *Vernonia kotschyana*
- Hepatisan, mot hepatitt. Laget av bladene fra *Combretum micranthum*
- Laxa-cassia, mot forstoppelse. Laget av bladene fra *Cassia italica*
- Malarial, mot malaria. Er en blanding av tre ulike planter: *Cassia occidentalis*, *Lippia chevalierii* og *Spilanthes oleracea*
- Psorospermin, mot eksem. Inneholder ekstrakt av røttene til *Psorospermum guineense* og hvit vaselin
- Koumbesane, brukes mot hoste, diaré og 'adaptogenic'. Består av tørkede blader fra *Guiéra senegalensis*
- Sumafura Tiemoko Bengaly, mot malaria. Denne ITM er under utvikling. Består av blader fra *Argemone mexicana*



Figur 7.2: Åtte ITM produsert av DMT, Mali, februar 2011

7.4 Feltarbeid

Feltarbeid i Mali ble utført i tidsrommet 20.januar til 20.februar 2011 for å skaffe informasjon om den tradisjonelle bruken av tre medisinsplanter: *Ximenia americana*, *Biophytum petersianum* og *Vernonia kotschyana*. Kun resultater for *Ximenia americana* (*X.americana*) vil bli omtalt. Intervjuene ble utført i Bamako, Siby, Dioila, Banatou og Fiana. Totalt 38 healere ble intervjuet.

Hvert intervju ble innledet med en introduksjon av de forskjellige deltakerne. Deretter ble healeren informert om hva vi ønsket å gjøre, hva informasjon ville bli brukt til, og om healeren samtykket intervjuet og godkjente bruken av ressursene som healeren ga. Alle healere som ble spurt, ga sitt samtykke. Hver healer ble intervjuet individuelt, og hvert intervju varte gjennomsnittlig i underkant av 20 minutter. Det ble stilt spørsmål om indikasjon, hvilken plantedel som ble anvendt, metode for tilberedning og dosering. Intervjuene ble utført på lokalspråket (Bambara) og fransk, som senere ble oversatt til engelsk. Professor Drissa Diallo var både intervjuer og tolk. Ved slutten av hvert intervju ble 2000 CFA francs og en pose med colanøtter mottatt av healeren. Resultatene er oppsummert i tabell 7.1- 7.5.

7.4.1 Intervju i Bamako

Det første intervjuet fant sted i Bamako 2. februar. Bamako ligger ved Nigerelven i den sørvestlige delen av landet. Professor Drissa Diallo var med som intervjuer og tolk, og det var én healer som ble intervjuet. Healeren oppga seks indikasjoner for *X.americana*. Resultatet fra intervjuet er presentert i tabell 7.1.

Tabell 7.1: Resultat fra intervjuet i Bamako

Healers navn, alder, kjønn	By/ landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Modibo Camara, 51 år, mann	Bamako	N'tongue	Menstruasjons smerter	Blad. Dekokt: 7 blader i 0.3 l vann. 2/3 av et teglass drikkes 1 gang daglig ved lite smerte, eller 2 ganger daglig ved sterk smerte. Drikkes inntil smerten forsvinner.
			Vaginitt	Stammebark. Dekokt av 2 håndfuller bark. Drikk 2/3 av et teglass med litt shea butter tilsatt. 0.8 l dekokt uten shea butter brukes til å vaske lokalt. Gjøres morgen og kveld i 1 uke.
			Candida infeksjon	Stammebark. Pulverisere. 2 fingre med pulver blandes med en bruskork olje og noen dråper limejuice. Appliseres på affisert område hver kveld til bedring. Barn: halv dose.
			Ryggsmerter	Rotbark (ytre). Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med en bruskork olje. Applisere dette på ryggen og i 'gropen' mellom stortåen og neste tå. Stå og

	gå i noen min. Anvendes morgen og kveld i minst 1 uke inntil bedring.
Magesår	<p>Rotbark (indre).</p> <p>Pulverisere. 2 deler pulver blandes med 1 del voanzou pulver og svelges.</p> <p>Eller:</p> <p>1 ts pulver løses i 0.2 l melk og drikkes.</p> <p>3 ganger daglig i 1 uke (gjelder for begge metoder).</p>
Tann smerter	<p>Rot. Pulverisere. 1 ts pulver løses i 0.1 l varmt vann.</p> <p>Skyll munnen i noen minutter.</p> <p>Ved hull i tennene appliseres 1 finger med pulver direkte på områdene.</p>

7.4.2 Intervju i Siby

9. februar ble de neste intervjuene gjennomført i Siby. Siby er et landlig distrikt som ligger 50 km sør for Bamako. Syv healere, fire menn og tre kvinner, ble intervjuet. Professor Drissa Diallo var intervjuer og tolk, og N’Golo Balo deltok som assistent. Resultatene er presentert i tabell 7.2.

Tabell 7.2: Resultat fra intervjuene i Siby

Healers navn, alder, kjønn	By/ landsby	Plantens lokalt navn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Farima Koné, 90 år, kvinne	Siby (Djissoumala)	Sene	Gingivitt	Stammebark. Macerasjon: 1 håndfull med knust stammebark blandes med 0.5 l vann i 15 min. Løsningen brukes til å skylle munnen med, og pulveret appliseres på gummen i noen min. Gjøres morgen og kveld i en uke.
Maimouna Coulibaly, 60 år, kvinne	Siby (Djissoumala)	Sene	Halsbetennelse	Blad. Dekokt: noen få blader i 1 l vann. Kokes inntil fargen i vannet forandres. Salt påføres tungen og dampen fra dekoktet inhaleres morgen og kveld i 2 dager.
Naténé Camara, 80 år, kvinne	Siby (Djissoumala)	Sene	Halsbetennelse	Blad og stamme. Dekokt: 1 bunt blad og stamme kokes i 1 l vann. Salt påføres tungen og dampen av dekoktet inhaleres. I tillegg drikkes 1 håndfull dekokt. Gjøres inntil bedring.

			Urinveisinfeksjon	Rot. Dekokt: 5 oppskårete rotbiter i 0.5 l vann, kokes inntil fargen på vannet forandres. 1 teglass drikkes 2 ganger daglig til bedring.
Fadama Keita, 86 år, mann	Siby (Djikono)	N'tongue	Magesmerter, magesykdommer	Rot. Pulverisere. 1 ts pulver løses i 0.5 l vann. Drikk 1 teglass 3 ganger daglig i 3 dager. Gravide kan også drikke dette.
			Anemi hos barn	Blad. Dekokt: 1 ts pulver løses i 1 teglass vann. Avhengig av alder skal det drikkes: Barn<5år: 1 ts dekokt Barn>5år: 1 teglass dekokt I tillegg skal kroppen vaskes med dekokt. Gjøres 2 ganger daglig inntil 3 dager.
			Tonic for barn	Stammebark. Dekokt: 1 ts pulver i 3 teglass vann. Drikk 1 teglass og resten til kroppsvask. Gjøres i 3 dager.
Sakaba Cambara, 82 år, mann	Siby (Djissoumala)	Sene	Tannsmert	Blad og stamme. Dekokt: 1 bunt blad og stamme kokes i 3 teglass vann. Halvparten av

				dekokt til inhalasjon, resten til munnvask. Gjøres hver morgen i 2 dager.
Fassé Camara, 72 år, mann	Siby (Kakala)	N'tongue	Amenoré	Rot. Pulverisere. 1 ts pulver svelges eller løses i varmt vann og drikkes. 1 gang daglig i 1-2 uker.
			Magesmerter	Rot. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med litt vann og drikkes. Smerten vil midlertidig forsvinne, men vil ikke forsvinne helt før etter 1 uke.
			Inflammasjon, tann smerter	Blad. Dekokt: noen få blader i liten mengde vann. Salt og hot chili påføres tungen, dampen fra dekoktet inhaleres 2 ganger daglig til kurert.
			Hull i tenner	Blad. Pulverisere. Pulver løses i olje og appliseres på tennene 2 ganger daglig til kurert.
Abou Traoré, 38 år, mann	Siby (Djissoumala)	N'tongue	Urinveisinfeksjon	Rot. Dekokt: drikk 1 teglass 3 ganger daglig i 3 dager. Ved bedring, drikk 1 gang daglig til kurert. Ved alvorlig

	urinveisinfeksjon skal dekokt blandes med tamarind. Eller: Rotbark. Pulverisere. 1 ss pulver for voksne og 1 ts pulver for barn. Svelges 1 gang daglig i 3 dager.
Tretthet (tonic)	Blad og stamme. Dekokt: 3 bunt blad og stamme kokes i 4 l vann. Vask kroppen 1 gang daglig i 4 dager.

7.4.3 Intervju i Dioïla

Intervjuene i Dioïla ble utført 12. til 14. februar. Dioïla ligger 200 km øst for Bamako. 26 healere, 17 menn og ni kvinner, ble intervjuet. Professor Drissa Diallo var intervjuer og tolk, og N’Golo Balo var med som assistent. Resultatene er presentert i tabell 7.3.

Tabell 7.3: Resultat fra intervjuene i Dioïla

Healers navn, alder, kjønn	By/ landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon, dosering
N’Golo Sidibé, 58 år, mann	Dioïla	N’tongue	Indre sår	Rotbark. Pulverisere. Pulver blandes med salt og svelges. Ta så mye man orker.
			Amenoré	Rotbark. Pulverisere.

				Pulver svelges 2 ganger daglig inntil bedring.
			Halsbetennelse	Blad. Dekokt: 1 bunt. Salt og chili påføres tungen. Dette gjøres også på innsiden og i midten av øvre og nedre lepper. Dampen fra dekoktet inhaleres 2 ganger daglig til bedring.
Djoba Togola, alder ikke angitt, kvinne	Dioila	N'tongue	Magesår	Rotbark. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med mat, 3 ganger daglig til bedring.
			Halsbetennelse	Blad. Dekokt: drikk 1 teglass, dampen fra resten av dekoktet inhaleres. Gjøres morgen og kveld til bedring. Barn: halv dosering.
Fousseny Coulibaly, 42 år, mann	Dioila	N'tongue	Dysmenoré	Rotbark. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med 1 teglass vann. Drikkes morgen og kveld i 10 dager.
			Dysenteri	Stammebark. Pulverisere. 2 fingre

				med pulver løses i 1 teglass melk (emulsjon, melk som har ligget over natten). Drikk morgen og kveld i 3-4 dager.
			Dårlig syn	Blad. Macerasjon: 7 bunt i 7 liter vann. Vask øynene morgen og kveld til bedring.
Kolifa Togola, 74 år, mann	Dioïla	N'tongue	Anemi, tonic, betennelse i ganen (gjelder barn)	Blad og stamme. Dekokt: drikk 1 teglass, resten til kroppsvask. Gjennomføres inntil bedring.
			Magesår	Rotbark. Pulverisere. 1 ts pulver løses i 0.5 l vann. Drikk 2 ganger daglig til bedring.
			Skjevhet i ryggrad	Rotbark. Dekokt: 1 ts pulver kokes i 0.5 l vann. Vask kroppen 2 ganger daglig til bedring.
Assétou Doumbia, 55 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Indre sår	Rotbark. Pulverisere. Bland pulver med vann og drikk. Skal vaske munnen i tillegg. Gjøres 2 ganger daglig i 3-4 dager.

				<p>Eller:</p> <p>Rotbark. Pulverisere. Bland med honning og spis 2 ganger daglig i 3-4 dager.</p> <p>Eller:</p> <p>Blad. Dekokt: drikk 2 ganger daglig i 3-4 dager.</p>
Halsbetennelse				<p>Blad. Dekokt: 1 bunt. Salt og chili påføres tungen, dampen fra dekoktet inhaleres. Gjøres morgen og kveld i 1 dag.</p>
Biama Konaté, > 60 år, mann	Sirimanbougou	N'tongue	Artritt	<p>Blad og stamme. Dekokt: 3 bunt i 2 l vann. Drikk nok og vask kroppen hver kveld, 3 dager for menn og 4 dager for kvinner.</p>
Tonic				<p>Rot. Dekokt. Vask kroppen 1 gang daglig i 3 dager.</p>
Bakary Sangaré, 45 år, mann	Dioïla	N'tongue	Indre sår, vaginitt	<p>Rot. Pulverisere. 1 ts pulver blandes med 1 teglass vann. Drikk 3 ganger daglig i 4 dager til 1 måned.</p>

			Gamle, eksterne sår	Rot, stamme og blad. Dekokt: kok 1 ss pulver av disse i 1 l vann. Vask såret med dekokt og påfør pulver på såret 1 gang daglig. Ved bedring annenhver dag.
Aliou Moriba Siolibé, 65 år, mann	Wakoro Babilébougou	N'tongue	Hoste (som skyldes hjertet)	Blad. Dekokt: for kvinner skal det brukes 3 bunt. Drikk 2 håndfuller med høyre hånd, og 2 håndfuller med venstre hånd. Menn skal bruke 4 bunt. Drikk 2 håndfuller med høyre hånd, og 1 håndfull med venstre hånd. I tillegg skal både menn og kvinner bruke dekokt til vask og dampbad. Gjøres 1 gang daglig i 3 dager for menn og 4 dager for kvinner.
			Hemoroide	Rot. Dekokt. Sitt ned i avkjølt dekokt 1 gang daglig i 3-4 dager
Brama Konaté, 60 år, mann	Sirimanbougou	N'tongue	Amenoré	Rot (østlig del). Kuttet opp og tørkes. Kok 1 håndfull røtter i vann i 2 t. Drikk 4 håndfuller

				(2 håndfuller fra hver hånd) inntil 4 dager.
			Konjunktivitt	Blad. Dekokt: 2 bunt. Vask øynene hver morgen.
			Mentale sykdommer	Loranthus-blad. Pulverisere. 3 fingre med pulver kastes i flammen. Til inhalasjon morgen, kl 15 og før sengetid i 1 måned.
Mariam Traoré, 66 år, kvinne	N'Diana	N'tongue	Feber	Blad og stamme. Pulverisere. 3 fingre med pulver løses i vann. Drikk 1 teglass og vask kroppen 1 gang daglig til bedring.
			Indre sykdommer, sterilitet hos kvinner	Rot. Dekokt. Putt 3 fingre med oppskårete røtter i en tekopp, og 3-4 teglass vann tilsettes. Drikk 1 teglass 3 ganger daglig til bedring.
Karotimi Sidebé, 58 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Indre sår, sterilitet	Rotbark av <i>X.americana</i> , <i>Securinega virosa</i> , <i>Ziziphus micronata</i> og <i>Tamarindus indica</i> . Pulverisere og blande.

				Mengde pulver av disse lik en bruskork blandes med grøt. Spis 1 gang daglig i 1 uke.
Nah Traoré, 64 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Tann smerter	Blad. Dekokt til inhalasjon og munnvask. Gjøres inntil bedring.
			Dysenteri	Rotbark. Pulverisere. Ønskelig mengde pulver blandes med fersk melk. Drikk 2 ganger daglig til bedring.
Moussa Sidibé, 65 år, mann	Dioïla	N'tongue	Oppkast	Rotbark. Pulverisere. 1 ts pulver blandes med 1 teglass vann. Drikk morgen, middag og kveld i 3 dager.
			Diabetes	Blad og stamme. Dekokt: 3 bunt kokes i 2 l vann. Drikk 1 teglass morgen, middag og før sengetid. Kontroller blodsukkeret etter 7 dager.
			Magesår	Stammebark. Pulverisere. 1 ts pulver svelges morgen, middag og før sengetid

				i 7 dager.
			Migrene	Frukt. Dekokt: 1 håndfull frukt. Vask hodet 3 ganger daglig i 3 dager. Eller:
			Migrene, neseblødning	Knuse frukt og blande med røkelse. Kast i flammen og inhalere 3 ganger daglig i 3 dager.
			Halsbetennelse	Blad. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med 30 g olje og appliseres på halsen. Gjør ofte, ingen fast dosering. Eller: Lag dekokt til inhalasjon. Gjør ofte, ingen fast dosering.
			Artritt	Blad. Pulverisere. 1 ts pulver blandes med 30 g olje. Påfør leddene morgen, middag og kveld i 3 dager.
Daouda Sidibé, >70 år, mann	Dioïla	N'tongue	Magesmerter etter fødsel	Rotbark. Pulverisere. ½ ts pulver blandes med grøt og spises 1 gang daglig i 4 dager.

Amineta Diarra, 51 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Halsbetennelse	Blad og stamme. Dampen fra dekokt til inhalasjon. Salt og chili legges på tungen. Gjøres morgen og kveld inntil bedring.
M'Penécoura Mariko, 100 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Halsbetennelse	Blad. Dekokt til inhalasjon. Putt salt og chili på tungen.
			Tonic	Loranthus-blad. Dekokt til kroppsvask.
			Blødning (ved forlenget menstruasjon)	Rotbark. Pulverisere. 2 fingre med pulver svelges 4 ganger daglig i 4 dager.
Bah Togola, 66 år, mann	N'Diana	N'tongue	Indre sår	Rotbark. Dekokt: 1 ts pulver kokes i vann med 1 tamarindfrukt. Filtrer og drikk 1 teglass 3 ganger daglig i 3 dager.
			Sår på hodet	Rotbark. Pulverisere. Vask såret og applisere pulveret 1 gang daglig i 3 dager. Bruk caps/lue for å beskytte såret.
			Halsbetennelse	Blad. Dekokt. Drikk 1 teglass og inhalere dekokt 1 gang daglig i 3

				dager.
Djénéba Mariko, 40 år, kvinne	N'Gala	N'tongue	Magesmerter	Rotbark. Dekokt: 1 ts pulver kokes i 3 teglass vann. Drikk 1 teglass hver dag. Eller: 3 fingre med pulver løses i 1 teglass og drikkes.
			Tonic (barn)	Blad. Dekokt: drikk 3 teglass og vask kroppen 1 gang daglig i 2 dager. Kan drikke av og til etter 2 dager.
Jacouba Fomba, 69 år, mann	Tiendo	N'tongue	Amenoré, magesmerter hos kvinner	Rotbark. Pulverisere. Spis 1 ts pulver hver dag i 4 dager.
N'Golo Fomba, 78 år, mann	Kamanbougou	N'tongue	Magesår	Rotbark. Pulverisere. Svelg 3 fingre med pulver morgen og kveld i 1 uke.
			Gamle sår	Rot. Dekokt brukes for å vaske sår. I tillegg skal pulver appliseres på såret. Gjøres 1 gang daglig i 7 dager.
Mahamoudo Traoré, 41 år, mann	Dioïla	N'tongue	Dysenteri	Rotbark. Pulverisere. Bland pulver med salt, 1 ts svelges. Gjøres kun én gang.

Lassina Doumbia, 57 år, mann	Dioïla	N'tongue	Magesår	Rotbark. Pulverisere. 2 fingre med pulver svelges direkte, eller løs pulveret i litt vann og svelg. Gjøres morgen og kveld i 1 uke.
			Halsbetennelse	Blad. Dekokt til munnvask og dampen fra dekoktet til inhalasjon. I tillegg skal 1 teglass drikkes 1 gang daglig i 3 dager.
Mamoudou Mariko, 58 år, mann	Dioïla	N'tongue	Amenoré	Rot. Kok 2 håndfuller oppskårete røtter lenge i 1.5 l vann. La det ligge over natta. Drikk 0.5 l én gang, hvis blødning ikke kommer kan det drikkes igjen.
			Levkoré	Rot. Dekokt: 2 ss røtter kokes i ½ l vann. Filtrer og drikk morgen og kveld til kurert.
Gaoussou Fofana, 47 år, mann	Dioïla	N'tongue	Influenza, halsbetennelse, bihulebetennelse	Blad. Pulverisere. 2 ss pulver kokes i ¼ l vann i 5 min. Til inhalasjon morgen og kveld i 3 dager.
			Livmorskraft	Rot. Pulverisere. 2ss pulver løses i ¼ l varmt

				vann. Brukes morgen og kveld i 2 måneder og 15 dager.
				Amenoré
				Rot. Samme framgangsmåte som for livmorskraft. Brukes morgen og kveld i 1-2 uker.
				Vaginitt
				Rot. Samme framgangsmåte som for livmorskraft. Vask nedentil med løsningen morgen og kveld i 1 uke.
Aissa Coulibaly, 35 år, kvinne	Dioïla	N'tongue	Halsbetennelse, tannmerter	Blad. Dekokt: 4-5 bunt. Damp til inhalasjon, 1 gang daglig inntil bedring.
				Dysmenoré
				Rotbark. Pulverisere. 4 ganger 5 fingre med pulver svelges 1 gang daglig i 3 dager.
				Dermatitt
				Frø. Pulverisere. Bland pulver med svovel og hvitløk. Påfør huden 2 ganger daglig til bedring.

Youssouf Sangaré, 80 år, mann	Sinflala	N'tongue	Angst	Blad og stamme. Dekokt til dampbad og kroppsvask 1 gang daglig i 7 dager. Etter 7 dager, legg blad og stamme på et sted hvor to veier møtes.
			Schistosomiasis	Rot (østlig og vestlig del). Dekokt: kok 1 håndfull røtter lenge i 1 vann. Filtrer og drikk 2 teglass morgen og kveld inntil kurert.

7.4.4 Intervju i Banatou

Det ble gjennomført et lite intervju i landsbyen Banatou 13.februar. Banatou ligger 25 km fra Dioila. To healere ble intervjuet sammen. Professor Drissa Diallo var intervjuer og tolk, og N'Golo Balo var med som assistent. Resultatet er presentert i tabell 7.4.

Tabell 7.4: Resultat fra intervjuet i Banatou

Healers navn, alder, kjønn	By/ landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Briama Samake, 81 år, mann og Gaoussou Dembeli, 66 år, mann	Banatou	N'tongue	Vaginitt	Rot. Dekokt: Kok 1 håndfull pulver med plantene <i>Walteria indica</i> og <i>Eliotropium indicum</i> . Løsningen overføres til et kar, sitt ned i løsningen 2 ganger daglig i 4 dager.

Smerte under armene	Blad. Dekokt: 1 bunt. Løsningen brukes til dampbad (hold dampen nær smerte området) 2 ganger daglig i 4 dager.
Hodepine	Blad. Dekokt. Vaske hodet med løsningen 2 ganger daglig i 4 dager.
Livmorprolaps	Rot. Samme framgangsmåte som for vaginitt. Men putt løsningen i en stor morter og sitt på den 2 ganger daglig i 4 dager
Hypertensjon	Blad. Dekokt: kok 1 ts pulver i ¼ l vann. Drikk 2 ganger daglig i 4 dager.

7.4.5 Intervju i Fiana

De to siste intervjuene ble utført i Fiana, som ligger 5 km fra Dioïla. Her ble to healere intervjuet. Drissa Diallo var intervjuer og tolk, og N’Golo Balo var med som assistent. Resultatet er presentert i tabell 7.5.

Tabell 7.5: resultat fra intervjuet i Fiana

Healers navn, alder, kjønn	By/landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Maténé Fomba, 80 år, kvinne	Fiana	N'tongue	Halsbetennelse	Blad og stamme. Dampen fra dekokt inhaleres 1 gang daglig i 2 dager.
Seydou Fane, 76 år, mann	Fiana	N'tongue	Malaria	Det fins 4 ulike metoder: 1. Blad og stamme. Vask kroppen med tradisjonell såpe og drikk 3 håndfuller dekokt hver dag i 3 dager. 2. Rotbark. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med litt vann og drikkes 3 ganger daglig i 3 dager. 3. Rot. Macerasjon: drikk ½ teglass hver dag i 3 dager. 4. Rotbark. Pulverisere. 3 fingre med pulver blandes med suppe eller mat 1 gang daglig i 3 dager.
			Meslinger	Blad og stamme. Dekokt. Drikk 3 håndfuller og vask kroppen hver dag i 3-7 dager.

7.5 Forklaring av ord og uttrykk

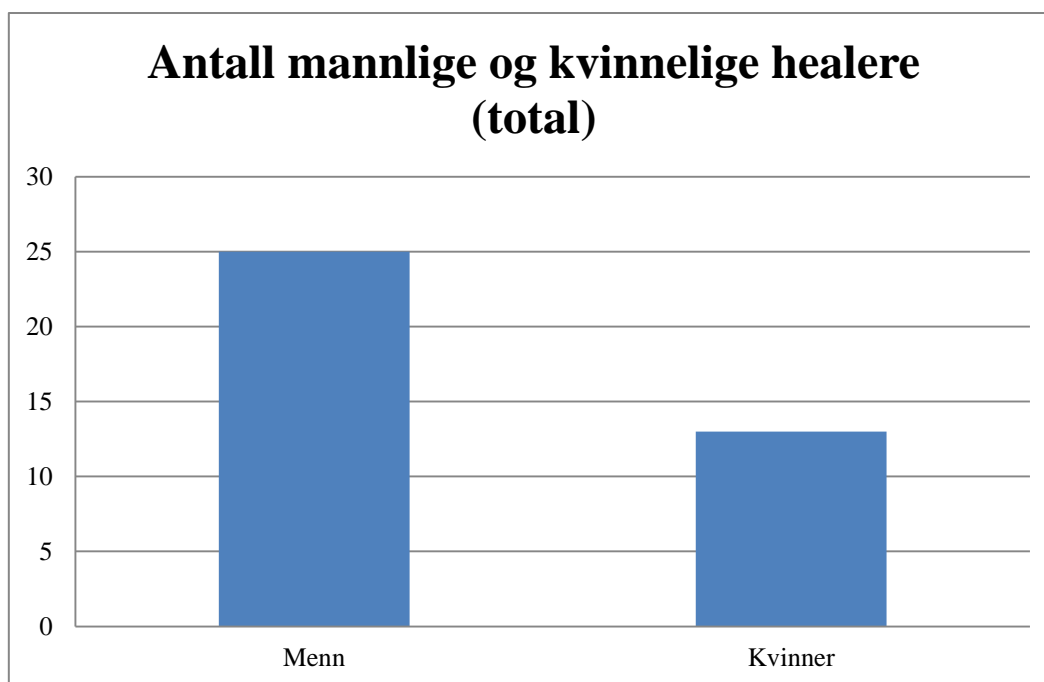
- Amenoré: manglende menstruasjonsblødninger
- Antall fingre: et mål for mengde plantemateriale, indikerer antall fingre som fungerer som en ”klype”
- Bunt: en bestemt mengde innsamlet og bundet plantemateriale
- Dekokt: uttrekk av plantedeler fremstilt ved koking
- Dermatitt: betennelse i huden
- Dysenteri: alvorlig tarmsykdom
- Dysmenoré: kraftige menstruasjonssmerter
- Gamle sår: sår som er mer enn ett år gammelt
- Gingivitt: betennelse i tannkjøtt
- Håndfull: materialet skal fylle hånda
- kl: klokke
- l: liter
- Levkoré: unormalt sterk hvit utflod fra skjeden
- Loranthus: parasittisk plante som vokser blant annet på *X.americana*
- Macerasjon: oppmykning og oppløsning under innvirkning av væsker
- min: minutter
- Schistosomiasis: en sykdom som fremkalles av ikter (flatormer) i slekten *Schistosoma*
- ss: spiseskje
- Teglass: en bestemt størrelse som anvendes i Mali, rommer ca. 70 ml
- Tonic: styrkemedisin
- ts: teskje
- Vaginitt: betennelse i skjedens slimhinne

7.6 Oppsummering

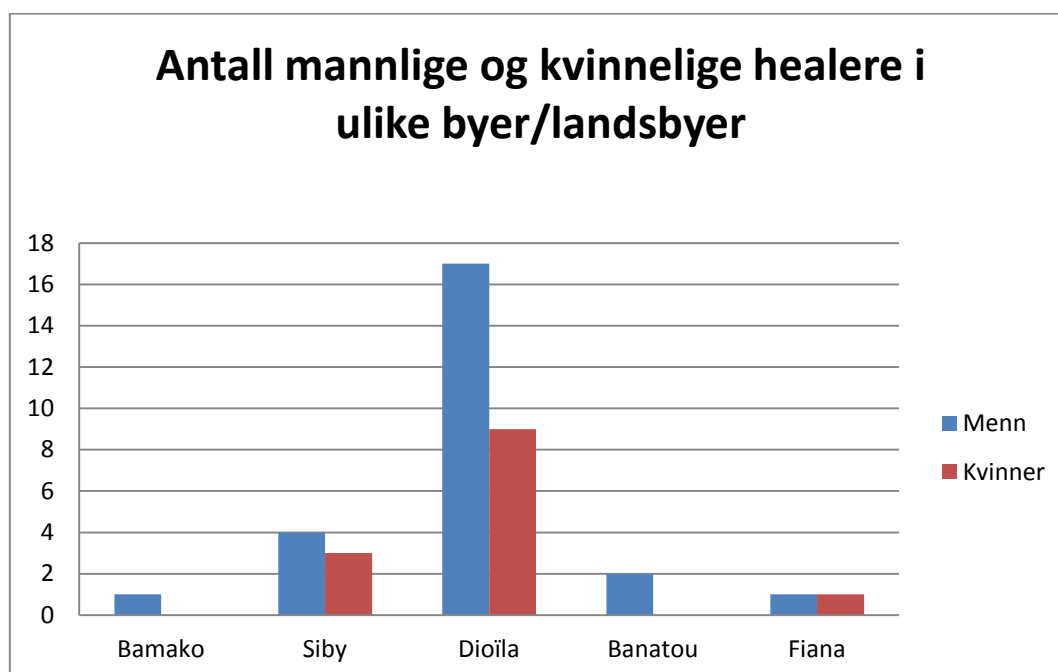
I dette feltarbeidet ble det intervjuet totalt 38 healere i fem ulike byer/ landsbyer. Alle de 38 healerne som ble intervjuet brukte *X.americana*, dette kan skyldes at *X.americana* vokser overalt og er lett tilgjengelig året rundt. Menn var i klart flertall ved praktisering som healere i forhold til kvinner (se figur 7.3 og 7.4): Av de som ble intervjuet var det 25 menn og den eldste var 86 år. 13 av de som ble intervjuet var kvinner og den eldste var 100 år. Det var noen healere som hadde problemer med å vite hvor gamle de var, derfor er det ikke sikkert at alle dataene stemmer fullstendig. I tillegg var det ikke alle steder vi fikk tid eller mulighet til å skaffe flere healere. Dette kan føre til at antallet kvinnelig healere er noe lavere enn virkeligheten. I Dioila samarbeider healere med leger ved et helsesenter. De holder møte en gang i måneden, og derfor fikk vi muligheten til å intervju mange healere her.

Det var 48 indikasjoner som ble oppgitt for *X.americana*. De hyppigste bruksområdene av *X.americana* er mot halsbetennelse, som tonic, mot amenoré, magesår, indre sår, tannsmarter, magesmerter og vaginit. Dette kan bli demonstrert av "Fidelity level" med følgende formel: $FI (\%) = (N_p/N) \times 100$. N_p er antall rapporterte brukere av planten mot en spesifikk tilstand, og N er total antall rapportører som bruker planten (Togola et al. 2008). For å ta hensyn til stor forskjell på antallet healere i de forskjellige stedene, blir FI beregnet for total bruk i alle byer/landsbyer og ikke hver av disse for seg. Resultatene er vist i tabell 7.6. Halsbetennelse er den mest rapporterte indikasjonen, med en FI-verdi på 34 %. Dette betyr at omtrent en tredjedel av healerne som ble intervjuet brukte *X.americana* mot halsbetennelse.

De to mest anvendte tilberedningsformene for *X.americana* er dekokt og pulverisering av plantemateriale. Blad, rotbark og rot er de mest brukte plantedelene (se figur 7.5). Dioila er det eneste stedet hvor healerne anvender *Loranthus*-blad, frukt og frø. Som tidligere nevnt, var det stor forskjell på antallet healere i de forskjellige stedene, og kan dermed medføre noe ujevn data. Å se på resultatene fra hver by/landsby hver for seg kan gi et misvisende bilde, derfor burde alle resultatene bli sett i sammenheng med hverandre for å gi et komplett bilde.



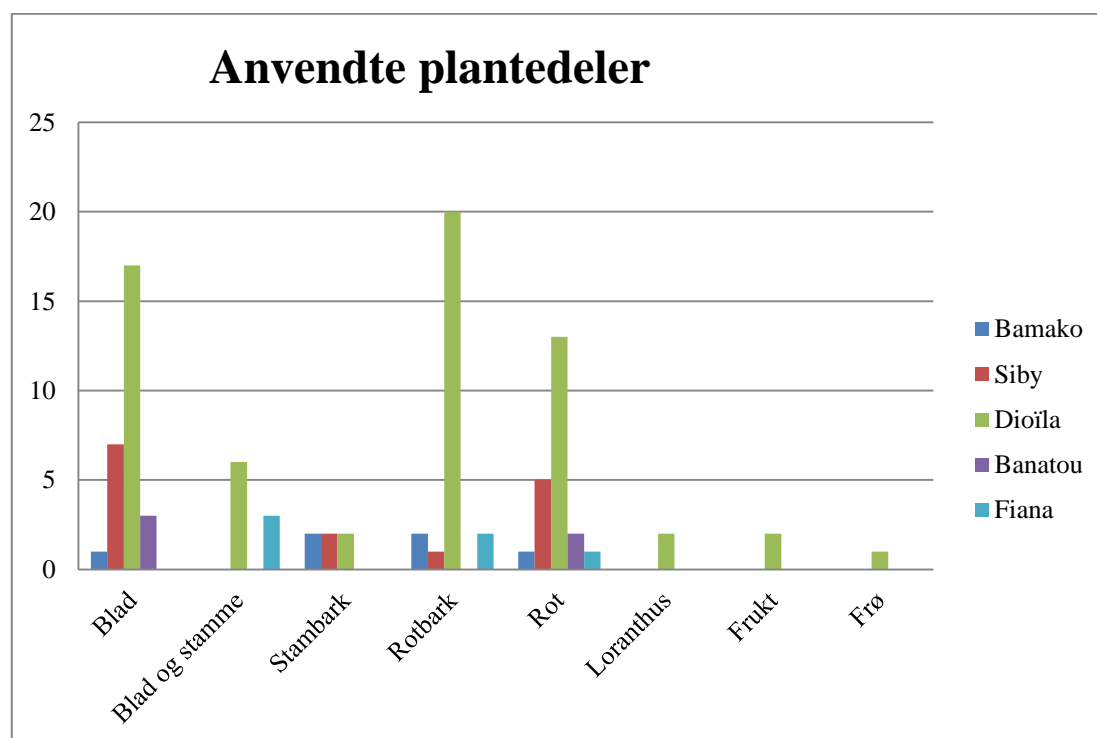
Figur 7.3: Antall mannlige og kvinnelige healere som ble intervjuet



Figur 7.4: Antall mannlige og kvinnelige healere i de ulike intervju-områdene

Tabell 7.6: Fidelity level (Fl i %). Bruk med en total Fl på mer enn 10% er vist.

Indikasjon	Total
Halsbetennelse	34
Amenoré	16
Tonic for barn	16
Magesår	13
Indre sår	13
Tannsmarter	13
Magesmarter	13
Vaginitt	11



Figur 7.5: Plantedeler anvendt i de ulike intervju-områdene.

8 Konklusjon

X.americana blad inneholder mange lavmolekylære forbindelser som bidrar til antioksidant- og antiradikaleffekt. Dette ble vist i ulike tester som DPPH-test, 15-LOX hemming og XO hemming.

Fra etylacetatekstraktet ble det cyanogene glykosidet sambunigrin isolert og identifisert. Det ble også funnet gallesyre, og gallotanninene β -D-glukogallin og 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose. I bioassay viste sambunigrin ingen spesielle hemmingseffekter på radikaler og oksiderende enzymer. Gallotanninene hadde noe effekter, hvor 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose hadde høyere hemmingsaktivitet enn β -D-glukogallin. Forskjellen i aktivitet skyldes at 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose har høyere molekylvekt og flere galloylgrupper i molekylet. Gallesyre hadde like god radikalscavenger effekt som den positive kontroll quercetin i DPPH-testen, men dårligere hemmingsaktivitet i de andre testene.

Det ble også isolert og identifisert seks flavonoider fra planten. Disse var: quercetin, quercetin-3-O-rhamnopyranosid, quercetin-3-O- α -arabinofuranosid, quercetin 3-O- β -D-xylopyranosid, quercetin 3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid og kaempferol 3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Aglykonet quercetin hadde høy aktivitet i alle tester. Glykosylerte flavonoider hadde noe dårligere hemmingsaktivitet fordi bundet glykosid reduserte aktiviteten. Resultatene på bioassay viste at galloyl-substitusjon, fri hydroksylgruppe i 3-posisjon i C-ringen og hydroksylgrupper i ortoposisjon i B-ringen økte hemmingsaktiviteten til flavonoider.

Av de isolerte forbindelsene er det kun sambunigrin som er tidligere isolert fra planten.

Under feltarbeidet i Mali ble det oppgitt mange indikasjoner for *X.americana*. De hyppigste var mot halsbetennelse, amenoré og som tonic for barn. Det fremkom også at de mest brukte plantedelene var blad, rotbark og rot. Plantedelene ble vanligvis tilberedt i form av et dekokt eller pulver.

Mange av de isolerte forbindelsene fra *X.americana* bidrar til biologiske aktiviteter og dette kan forklare den medisinske tradisjonelle bruken av planten. I denne sammenheng er det interessant at planten brukes mot infeksjonssykdommer.

8.1 Forslag til videre arbeid

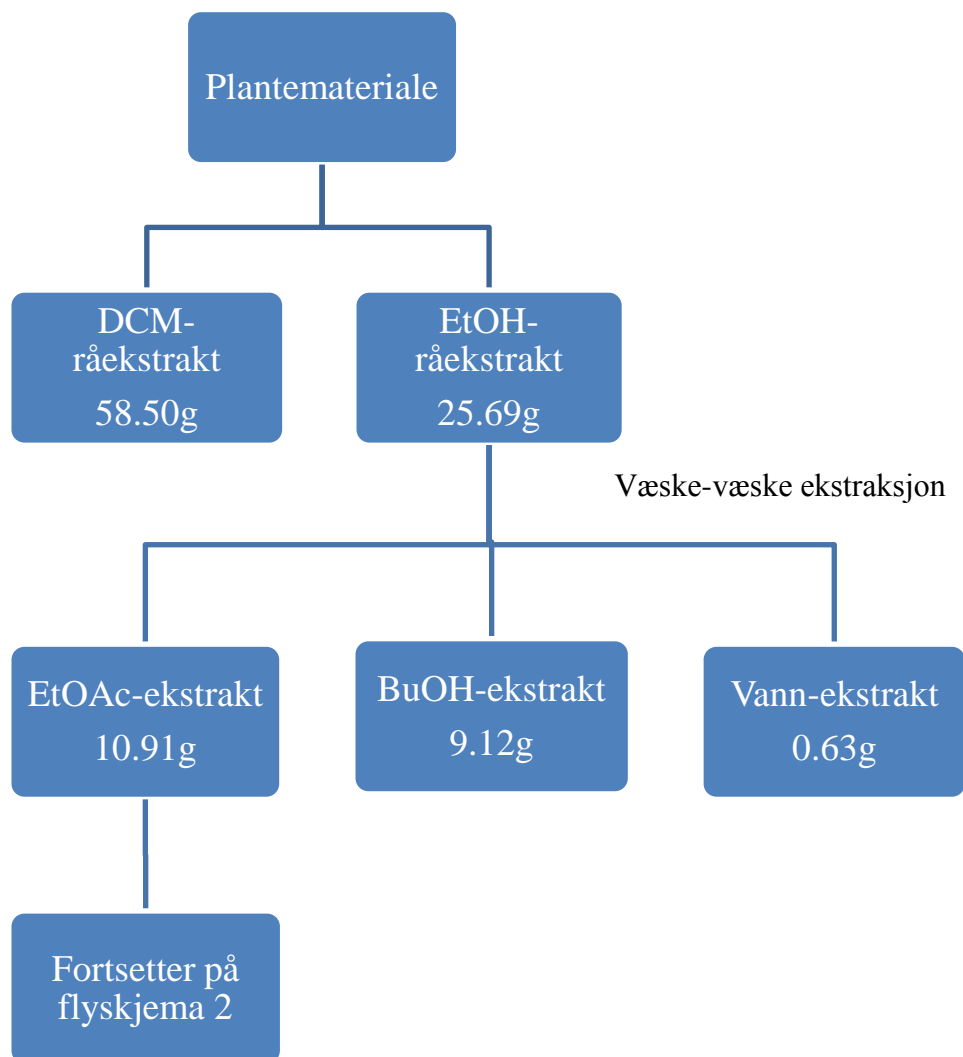
Det er fortsatt mange ekstrakter og fraksjoner som ikke er blitt isolert og identifisert. Det vil være av interesse å undersøke:

- Fraksjon E6.4: NMR-spektrene viste at denne fraksjonen hadde en del signaler lik fraksjon E6.2-3 (denne fraksjonen ga sambunigrin og flavonoidene). Derfor er det interessant å arbeide videre med denne fraksjonen.
- Butanol-ekstraktet: Det er ikke blitt gjort noe med dette ekstraktet ennå. Derfor er det interessant å undersøke hvilke stoffer som finnes her.
- Vannekstraktet: Dette ekstraktet hadde dårlig antioksidant-og antiradikaleffekt i bioassay, men det kan likevel undersøkes videre.
- På grunn av lite stoff ble det ikke utført 15-LOX hemming og XO hemming på β -D glukogallin, 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose og kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid. Dette vil være aktuelt å gjennomføre.

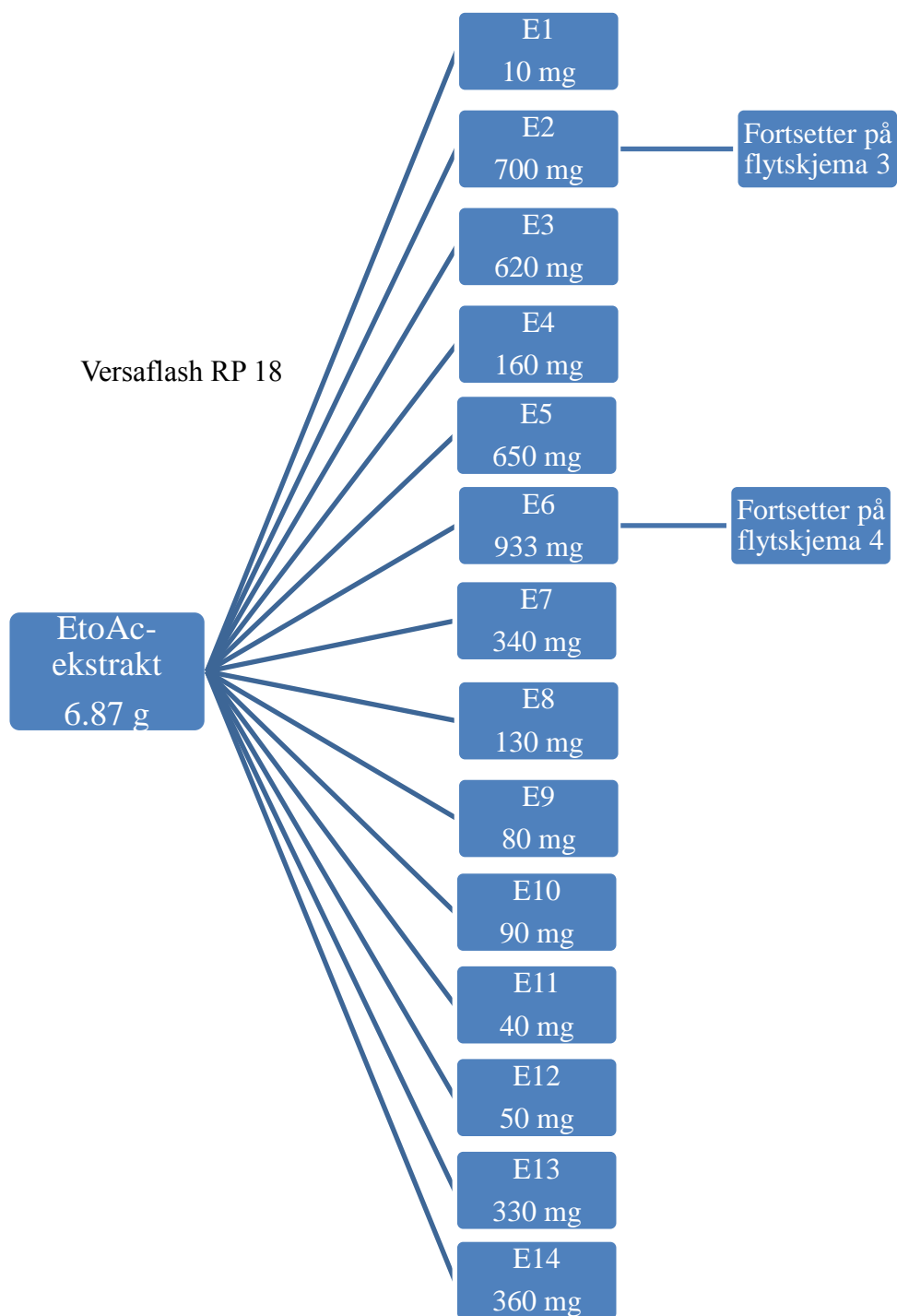
9 Vedlegg

9.1 Flytskjema

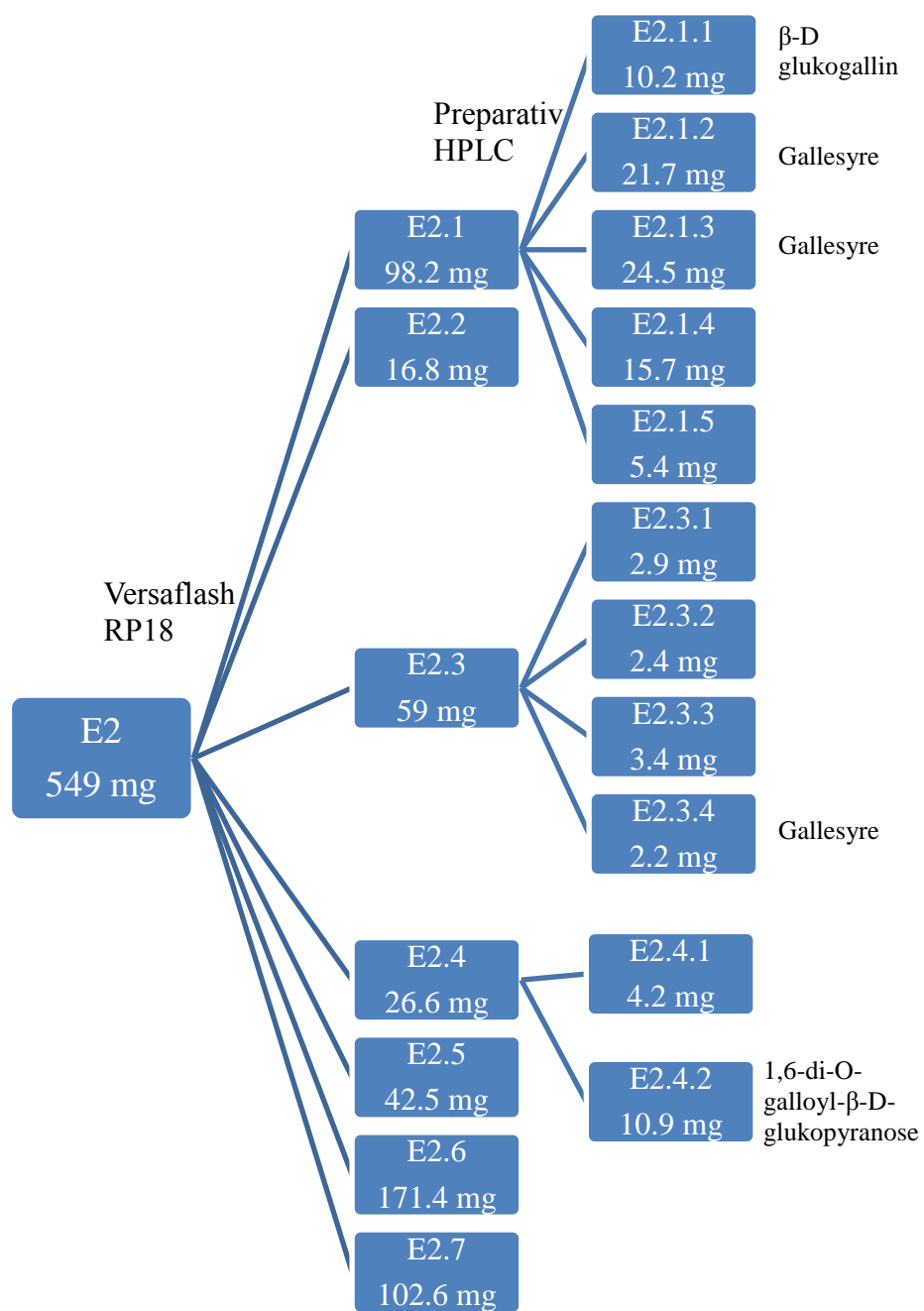
9.1.1 Flytskjema 1



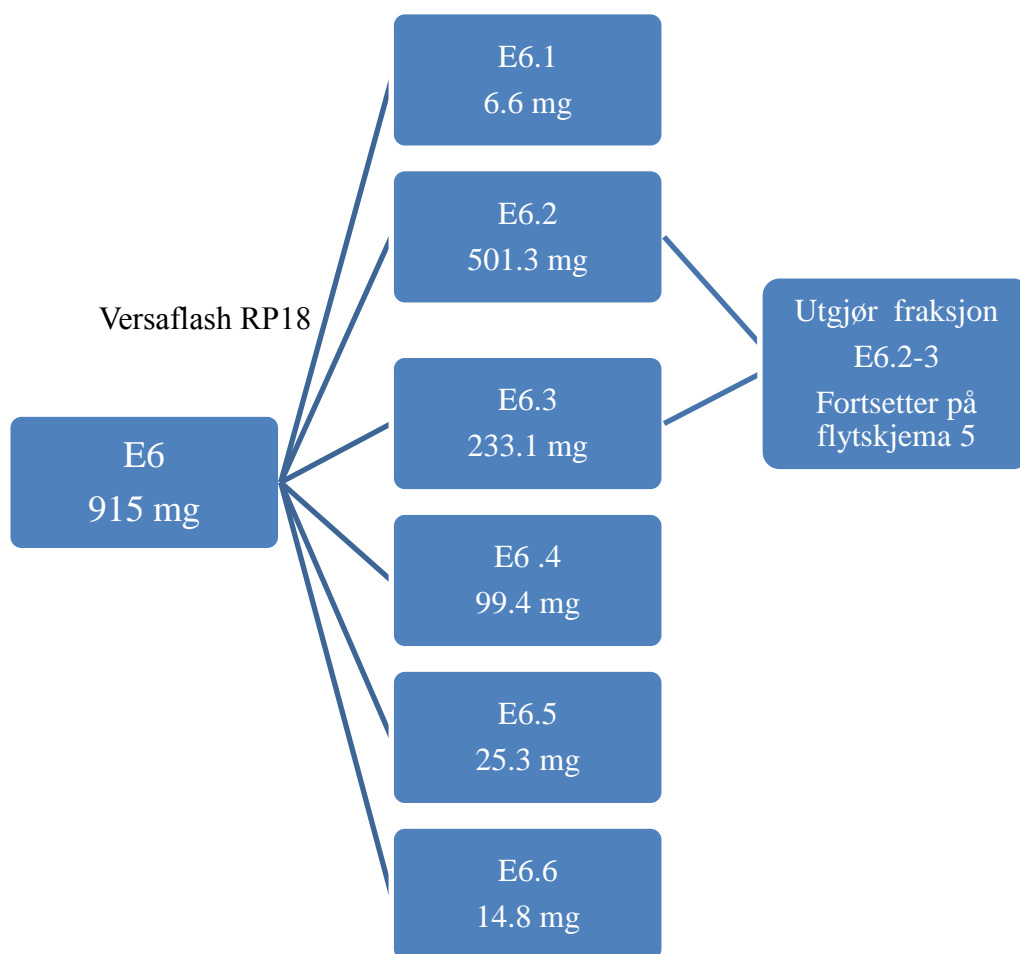
9.1.2 Flytskjema 2



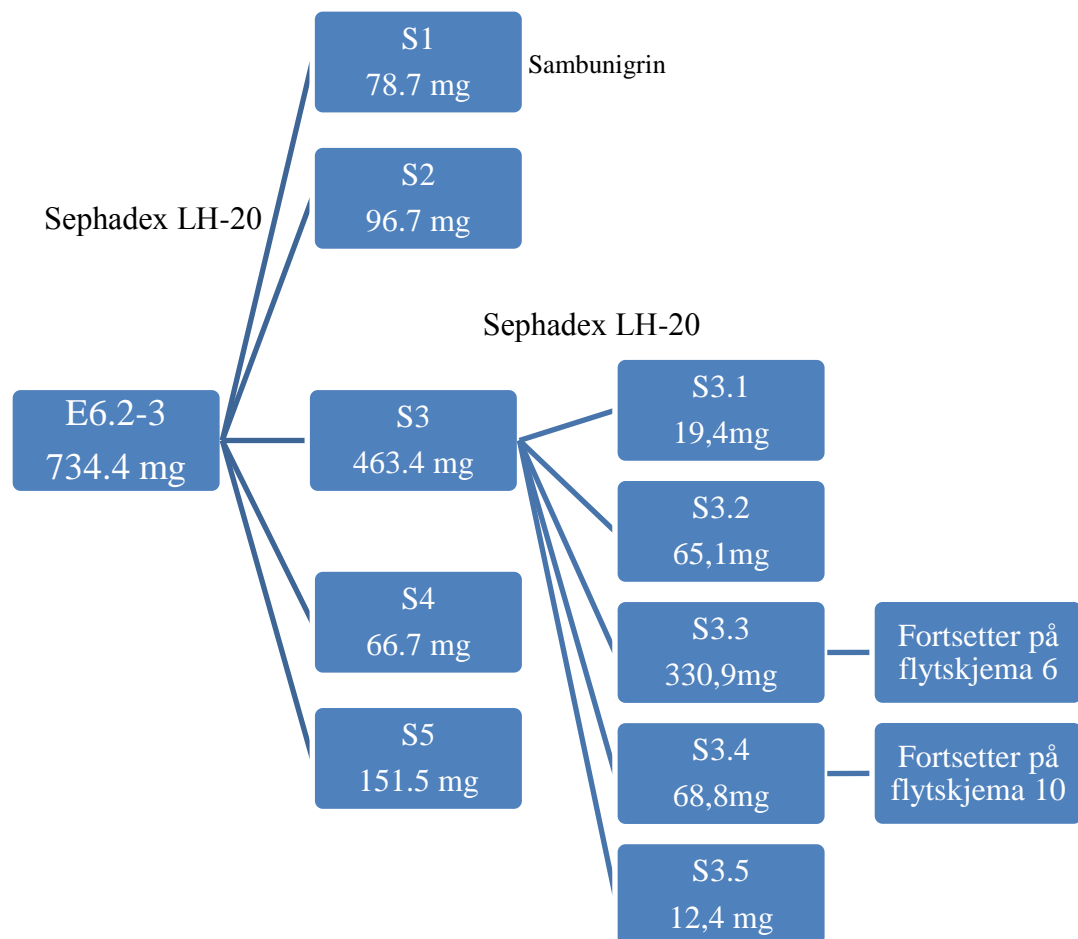
9.1.3 Flytskjema 3



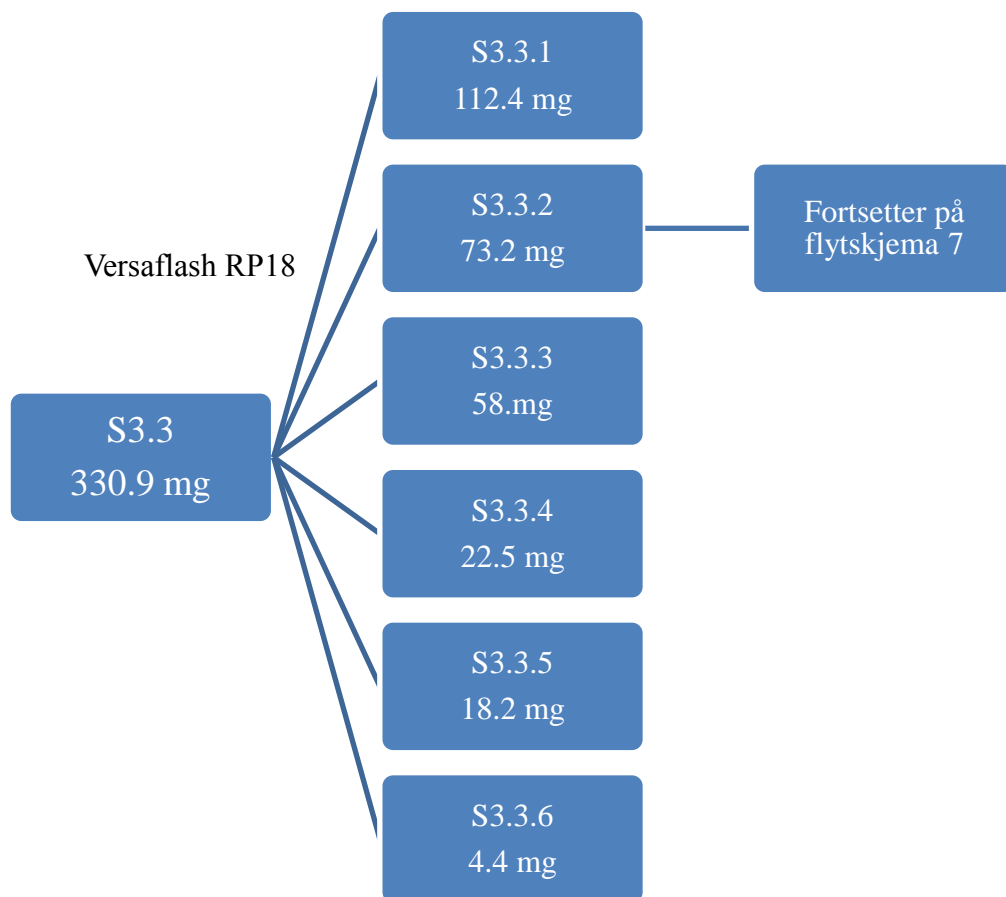
9.1.4 Flytskjema 4



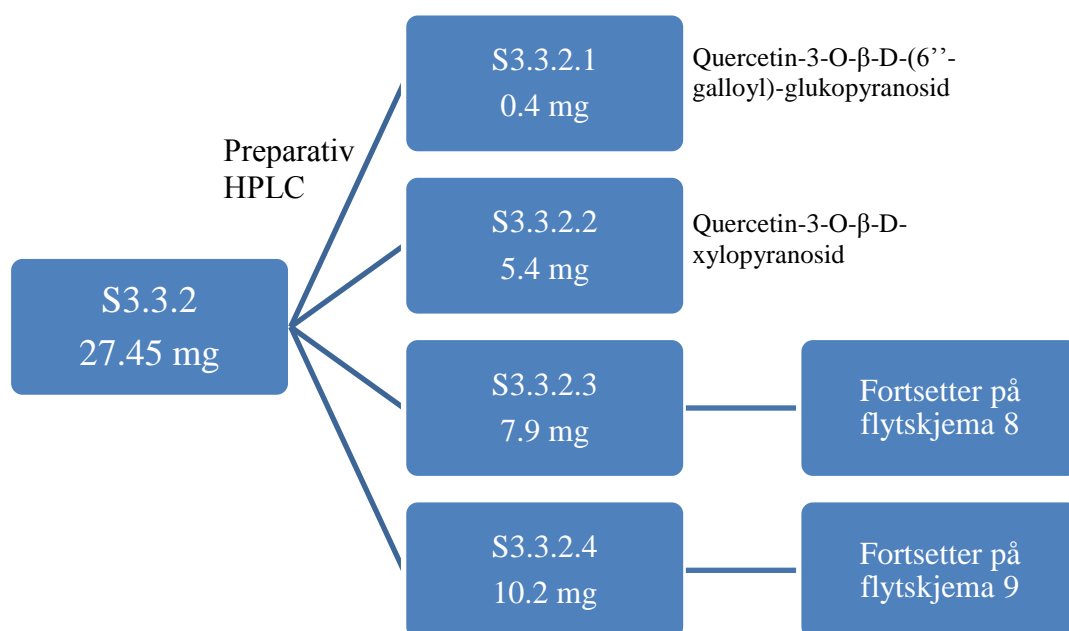
9.1.5 Flytskjema 5



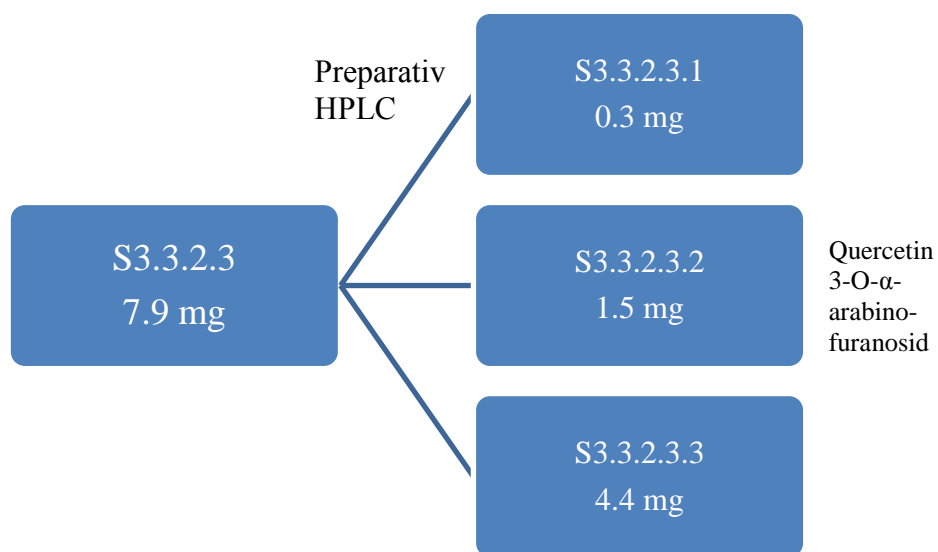
9.1.6 Flytskjema 6



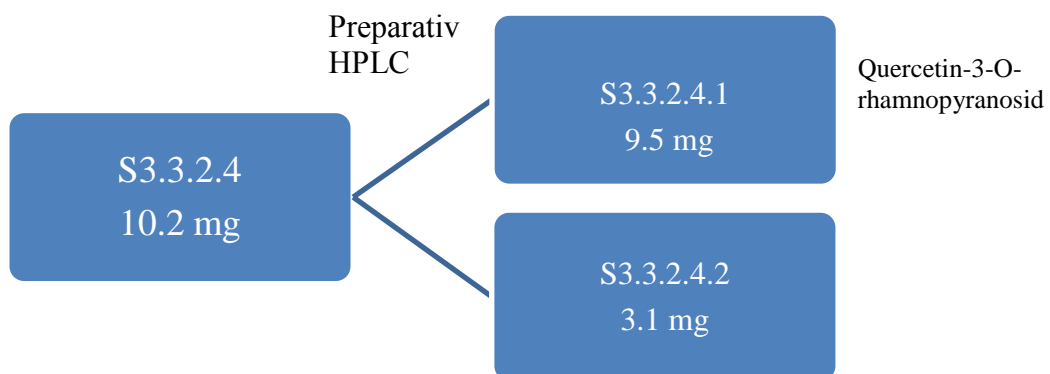
9.1.7 Flytskjema 7



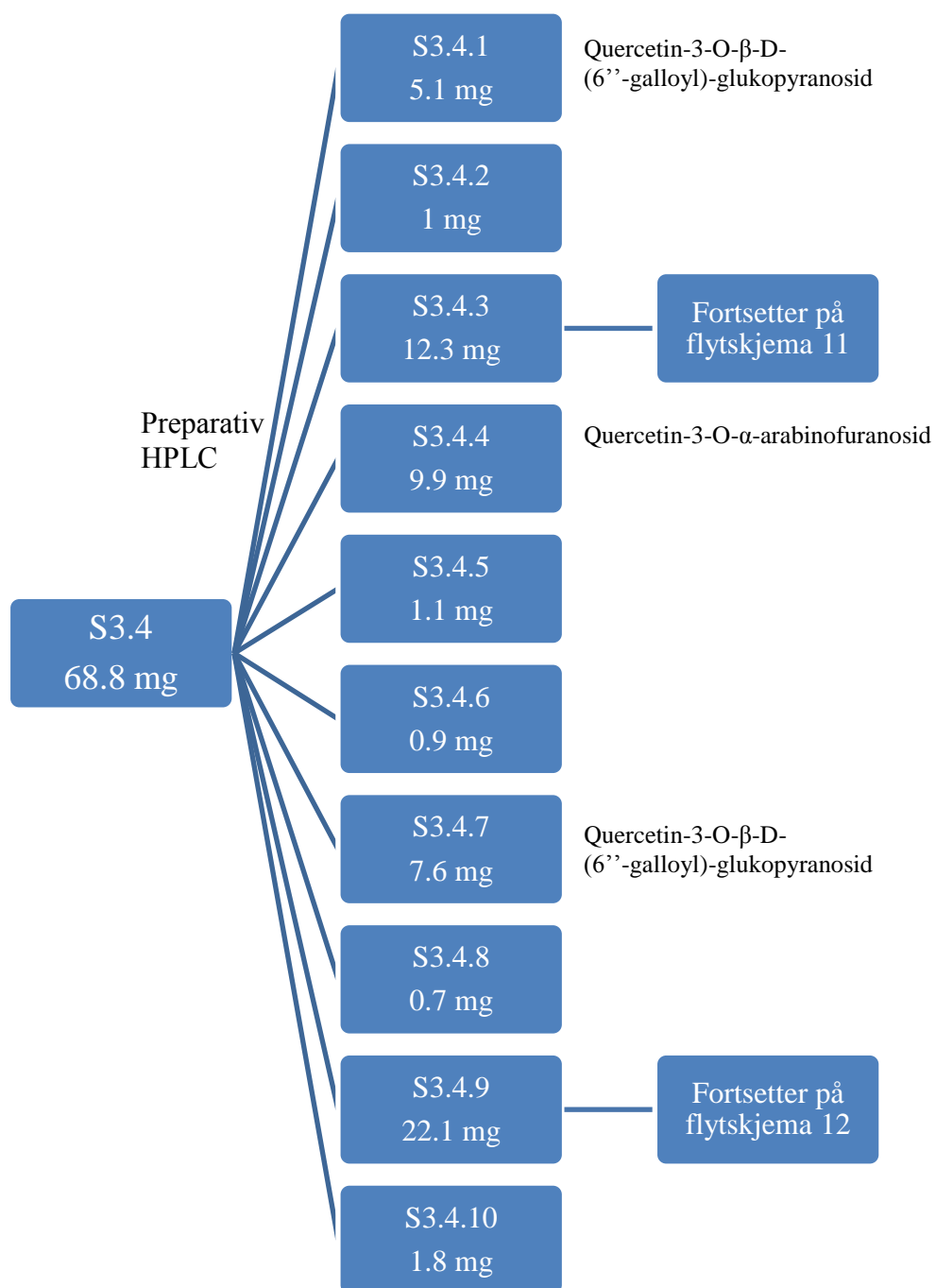
9.1.8 Flytskjema 8



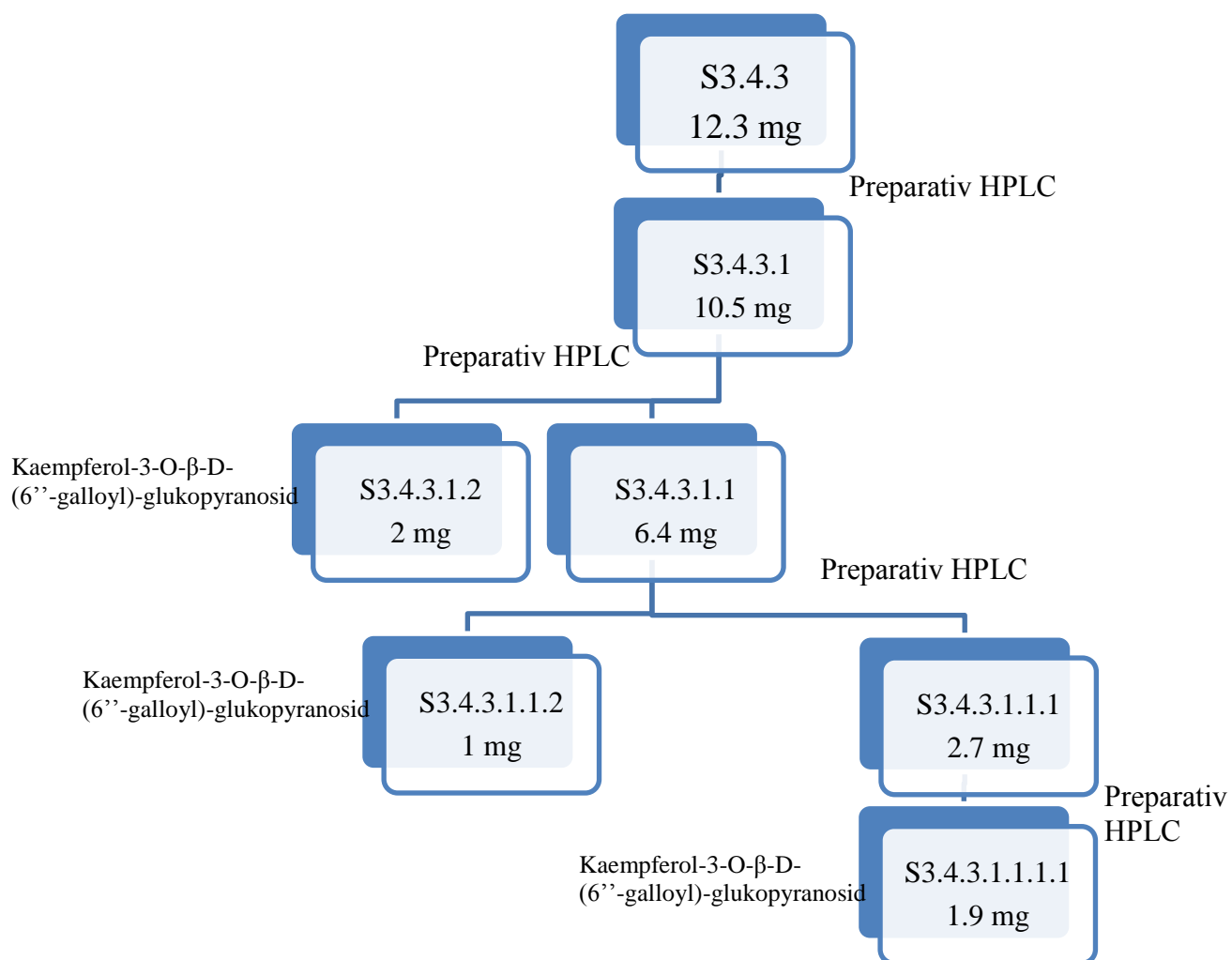
9.1.9 Flytskjema 9



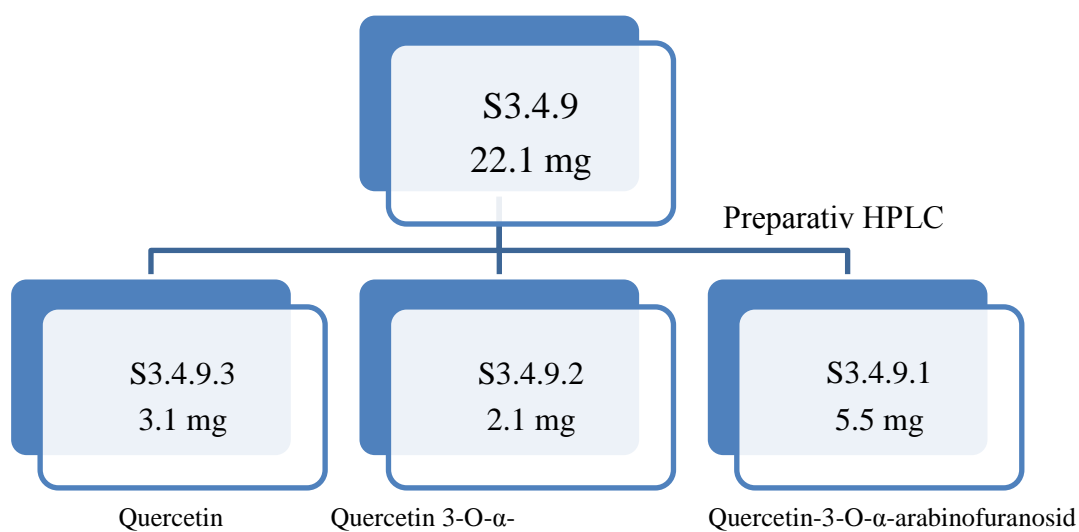
9.1.10 Flytskjema 10



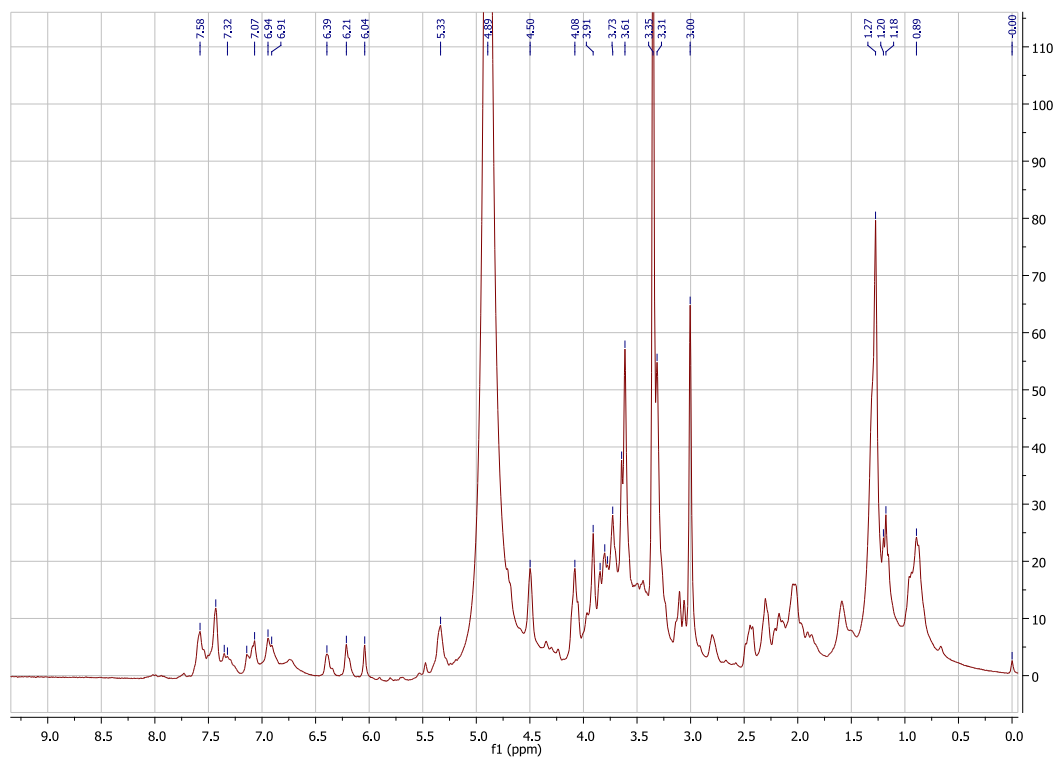
9.1.11 Flytskjema 11



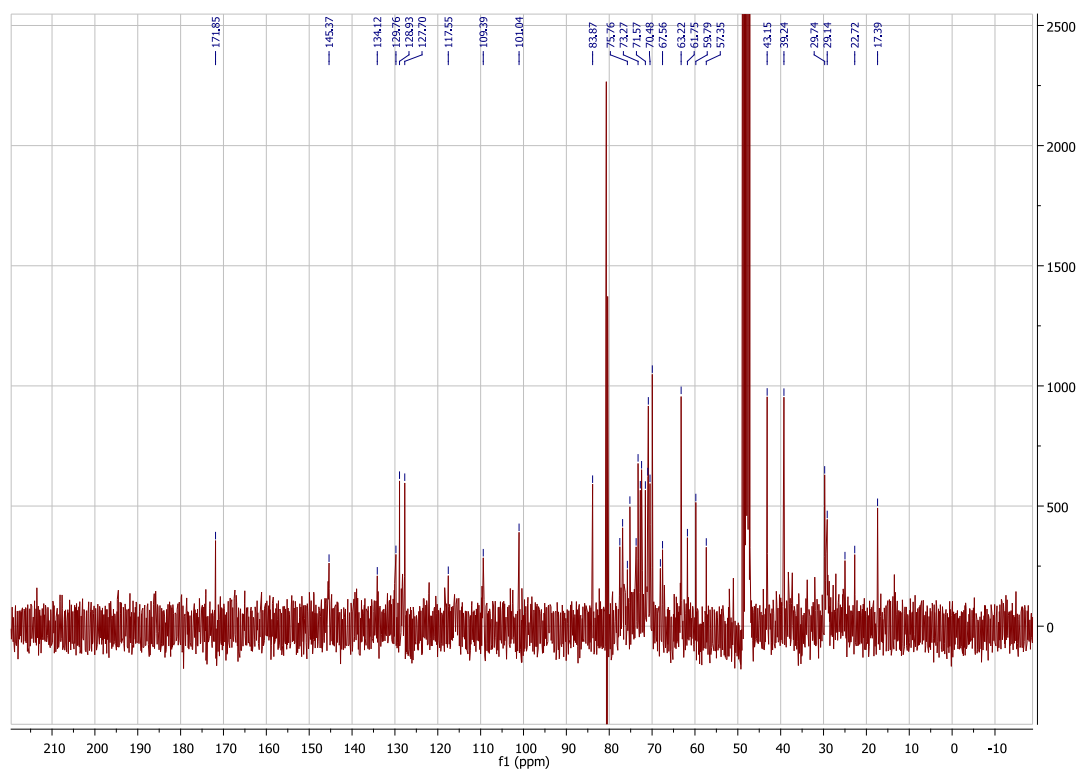
9.1.12 Flytskjema 12



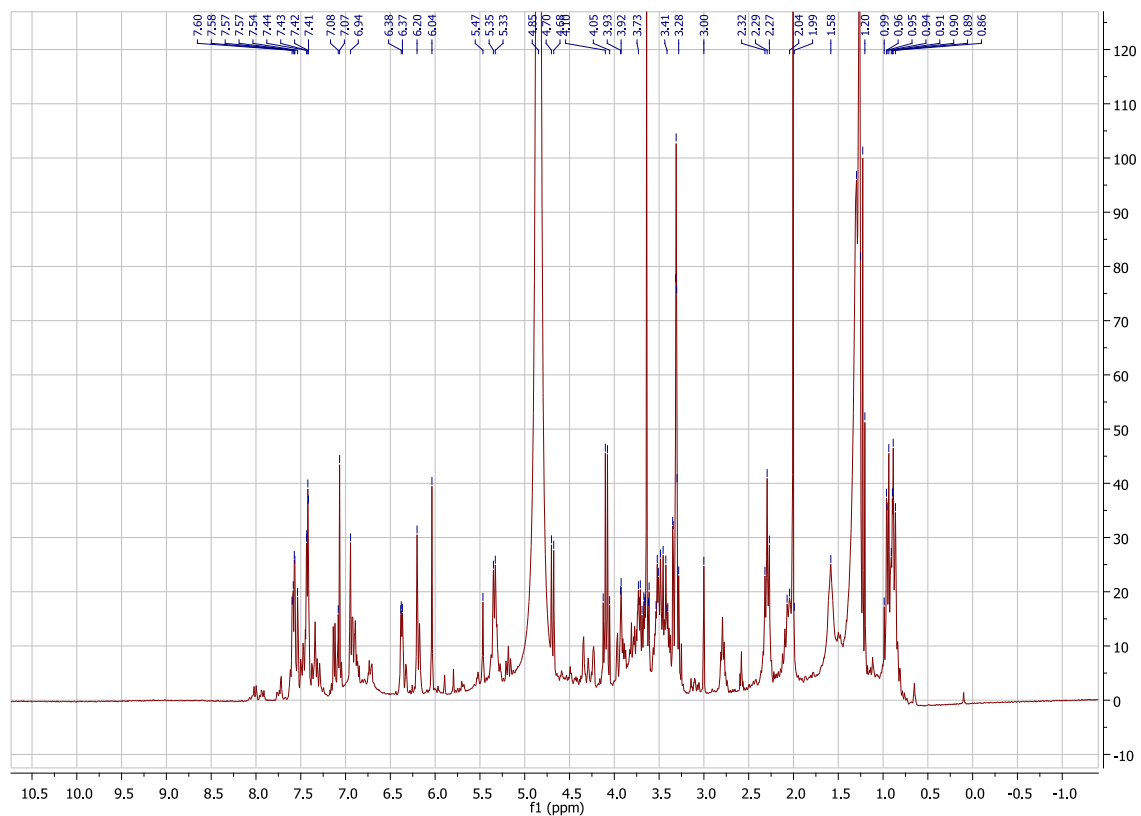
9.2 NMR-spektra



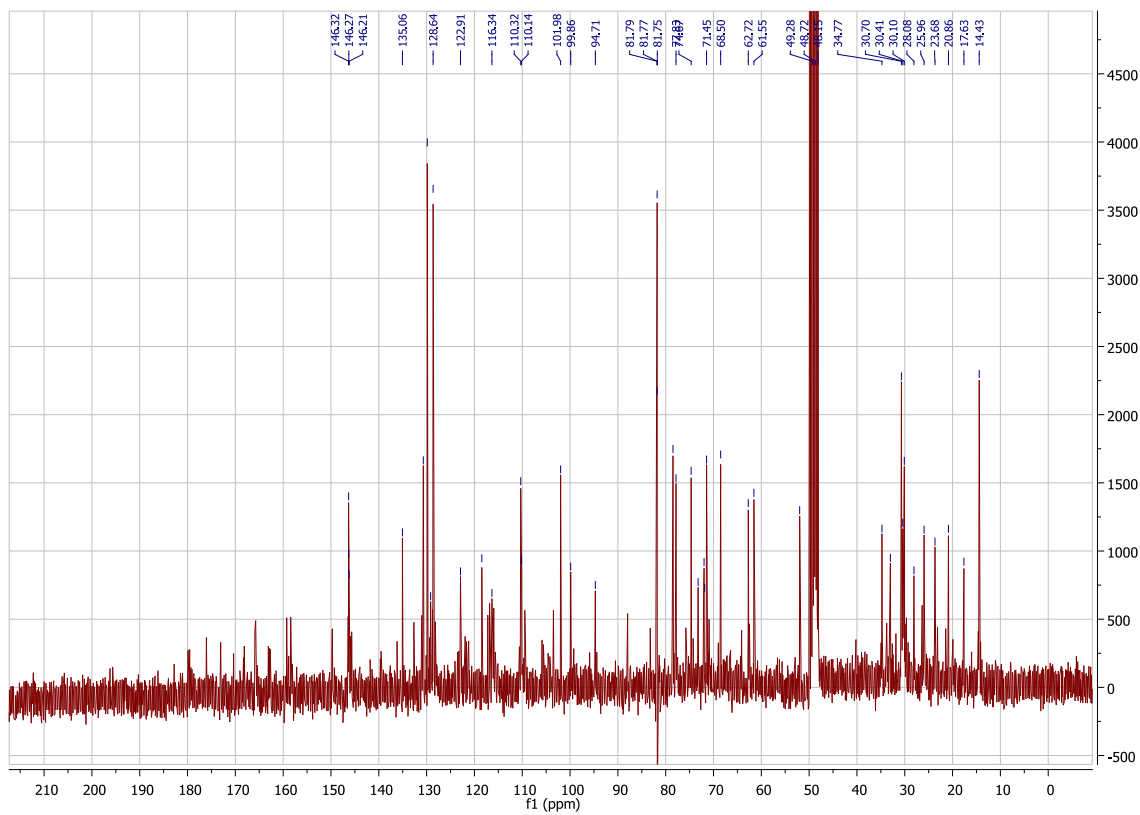
NMR-spekter 1: ^1H NMR spekter EtOH-råekstrakt (CD_3OD)



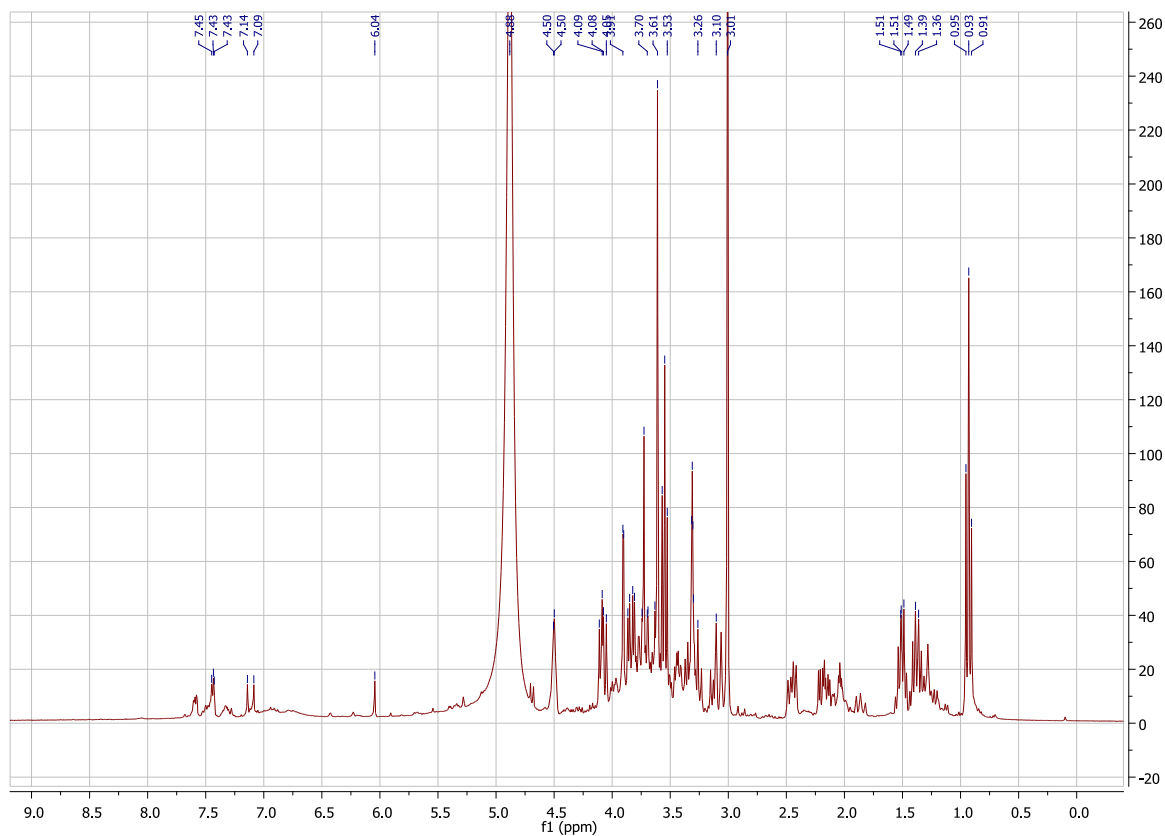
NMR-spekter 2: ^{13}C NMR-spekter EtOH-råekstrakt (CD_3OD)



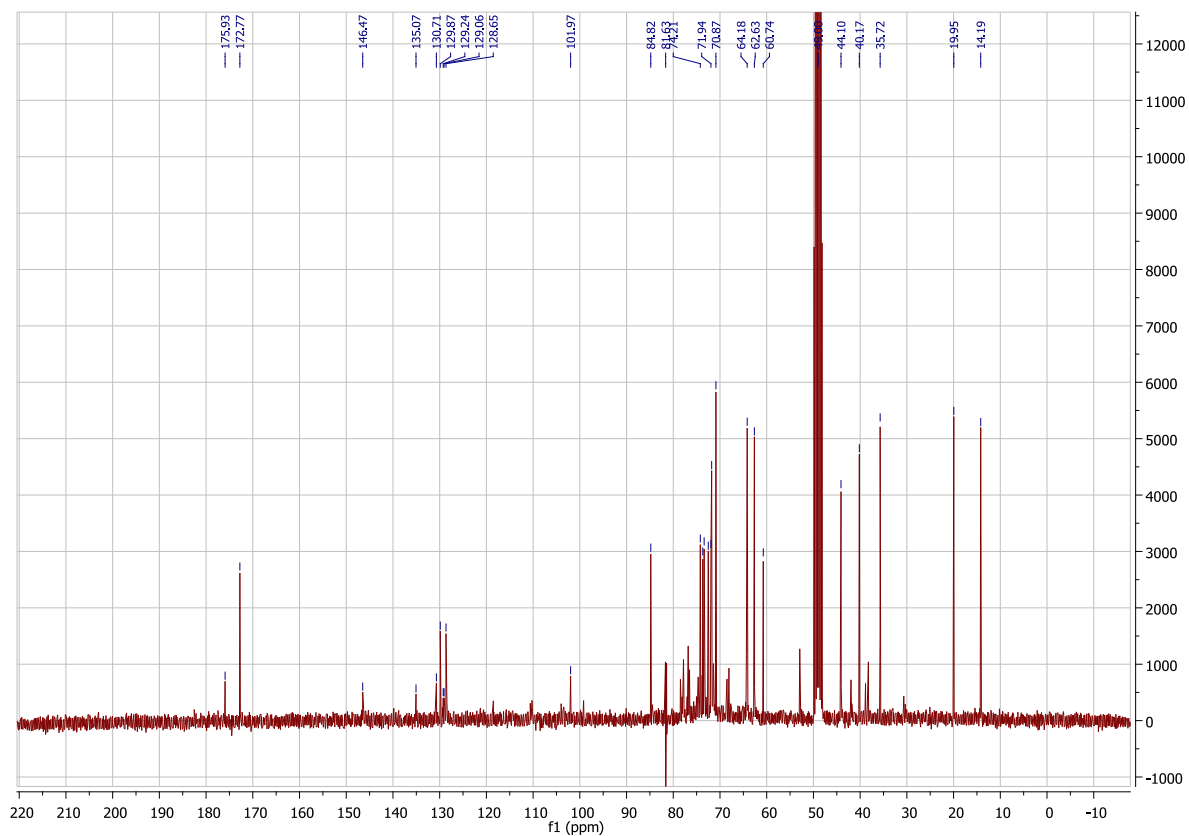
NMR-spekter 3: ¹H NMR-spekter EtOAc-ekstrakt (CD₃OD)



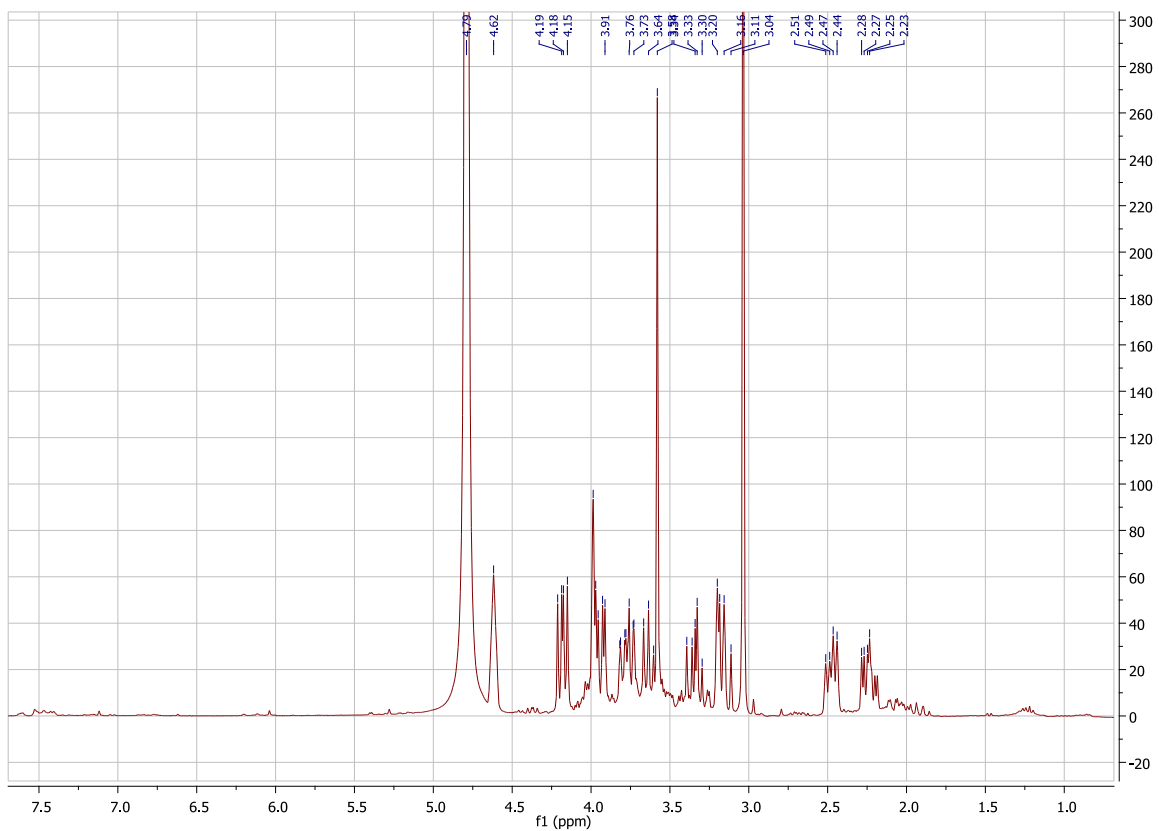
NMR-spekter 4: ¹³C NMR-spekter EtOAc-ekstrakt (CD₃OD)



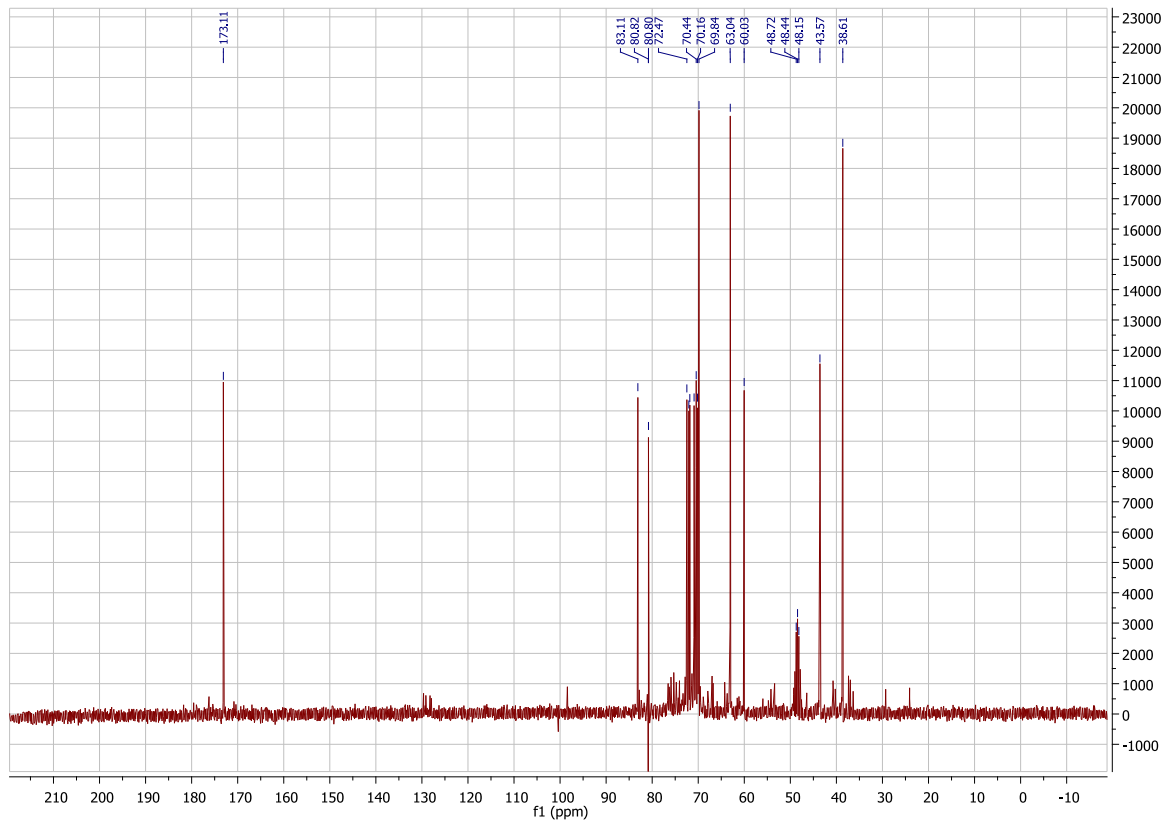
NMR-spekter 5: ¹H NMR-spekter BuOH-ekstrakt (CD₃OD)



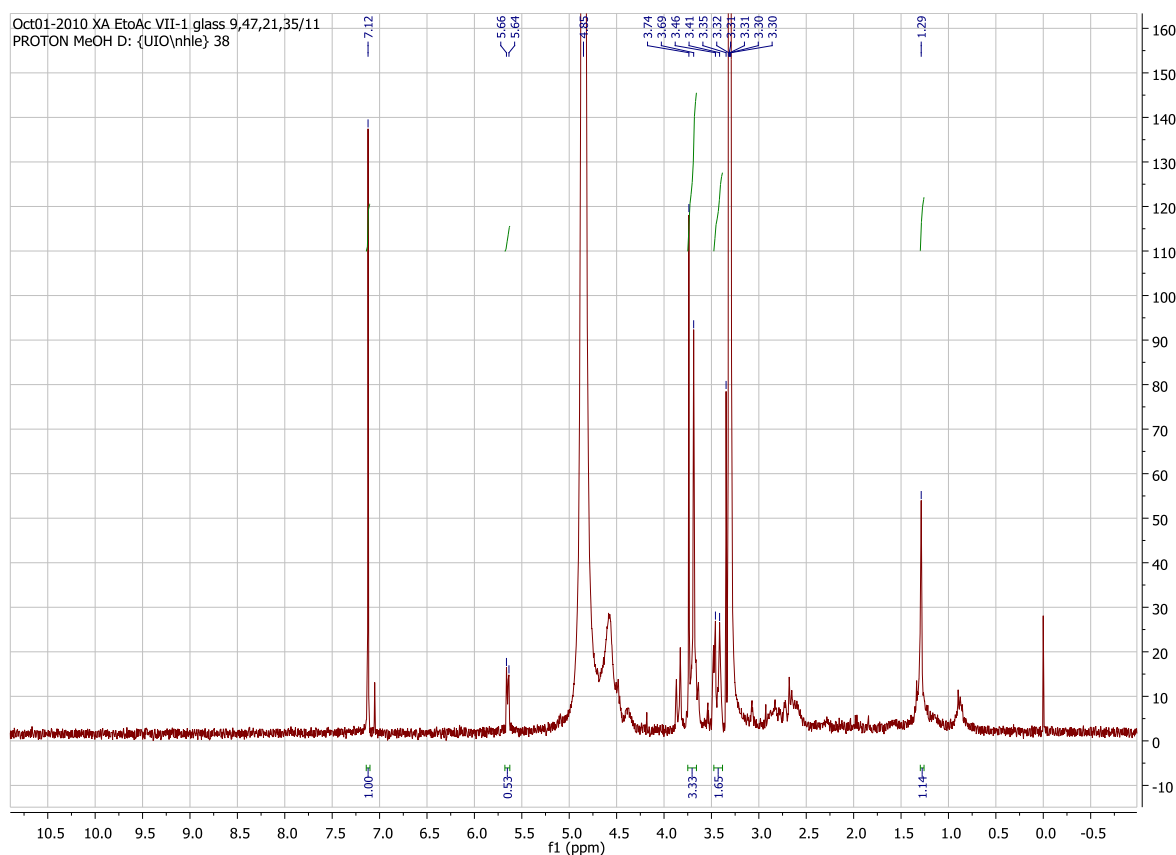
NMR-spekter 6: ¹³C NMR-spekter BuOH-ekstrakt (CD₃OD)



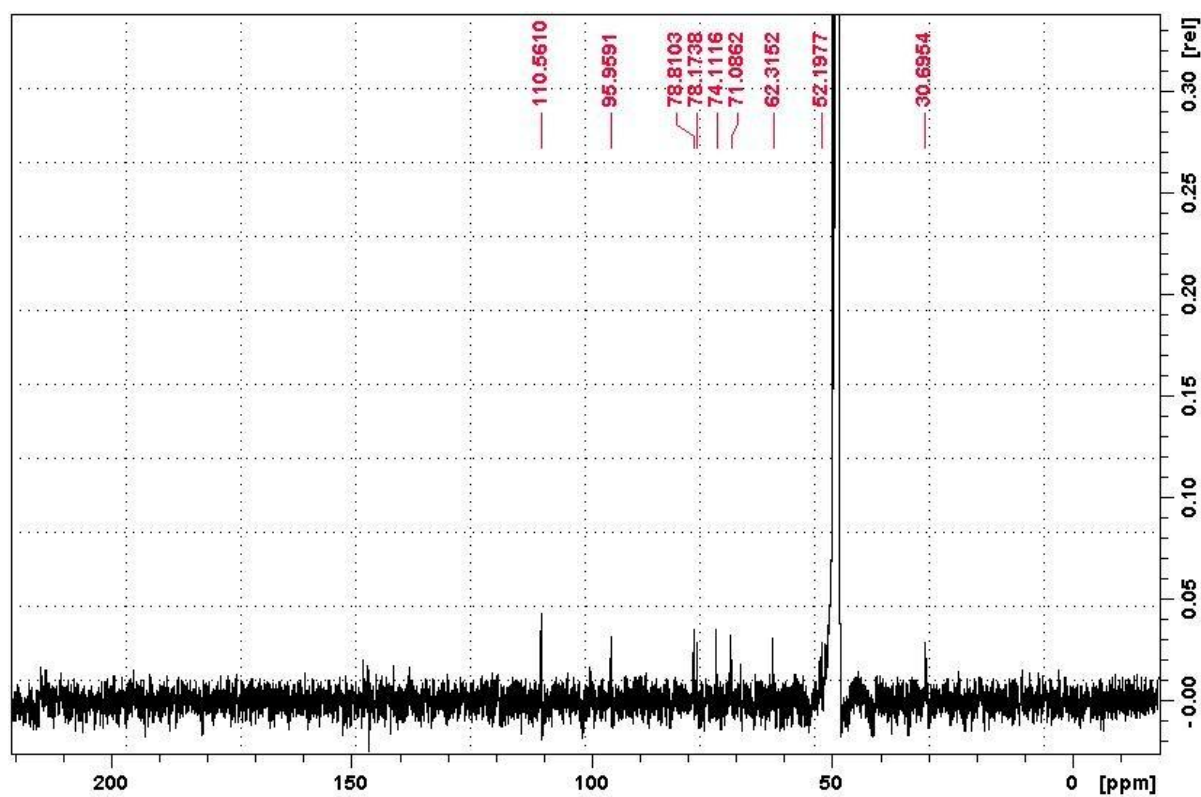
NMR-spekter 7: ^1H NMR-spekter vannekstrakt (D_2O)



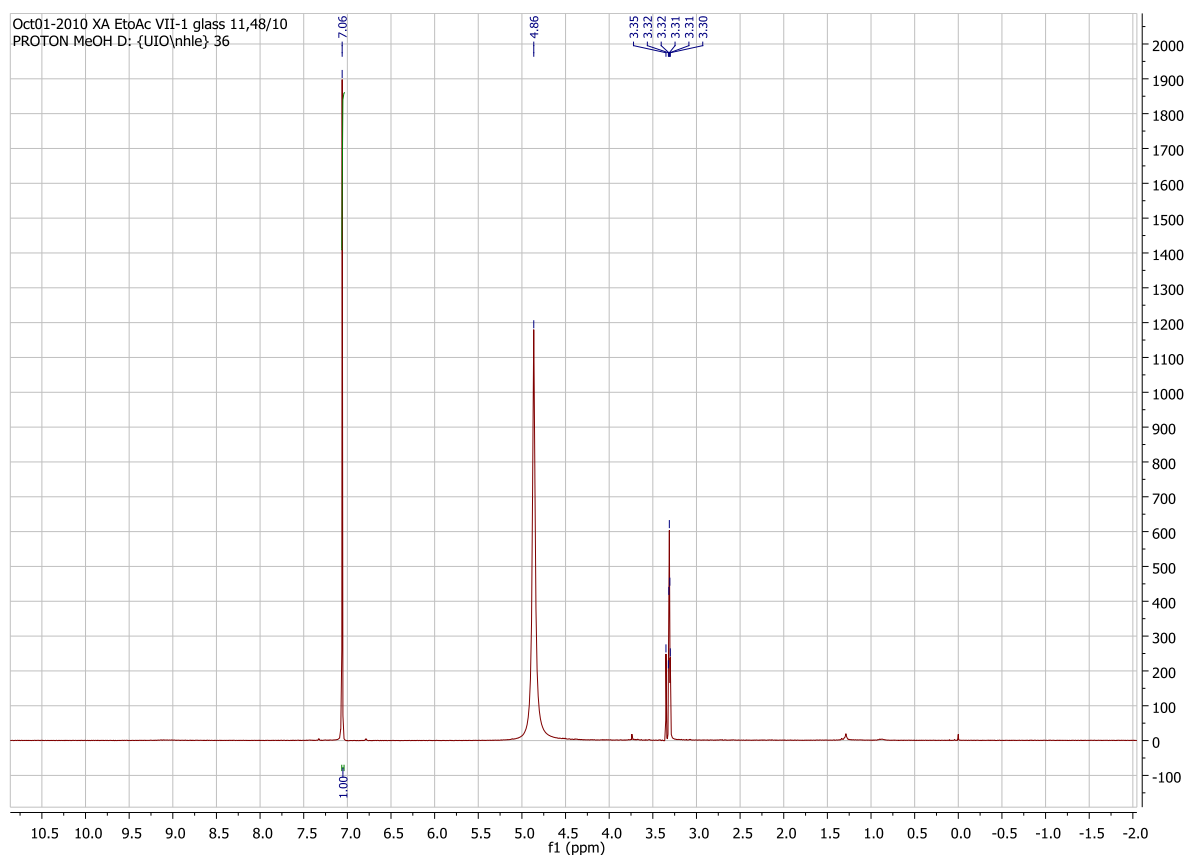
NMR-spekter 8: ^{13}C NMR-spekter vannekstrakt (D_2O)



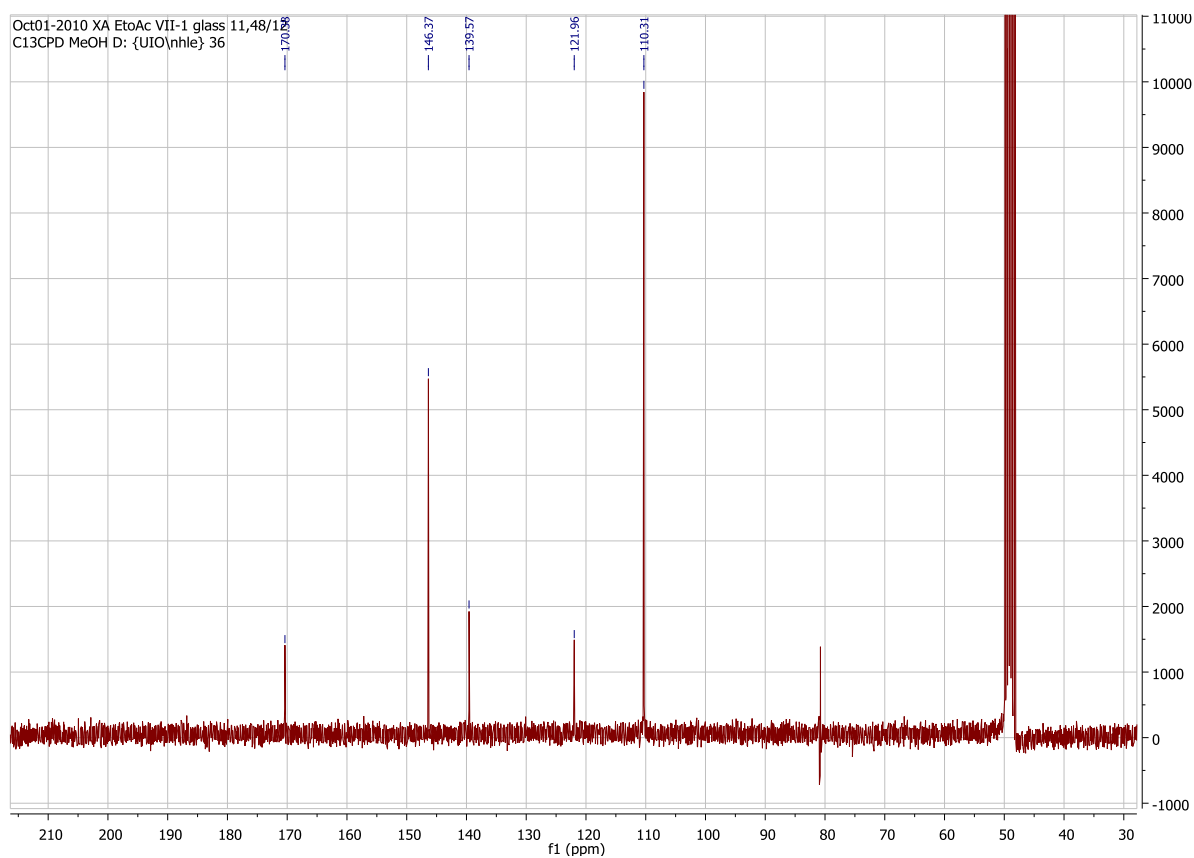
NMR-spekter 9: ^1H NMR-spekter β -D-glukogallin (CD_3OD)



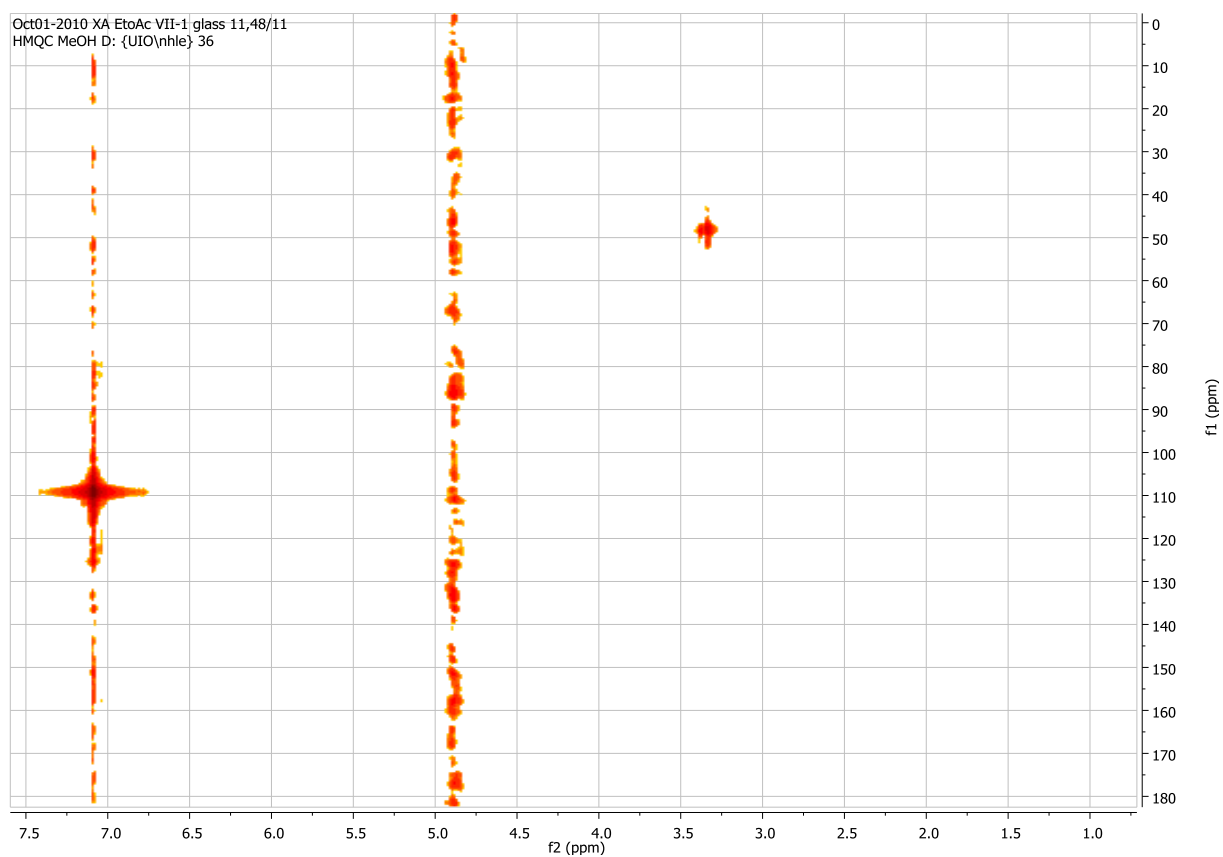
NMR-spekter 10: ^{13}C NMR-spekter β -D-glukogallin (CD_3OD)



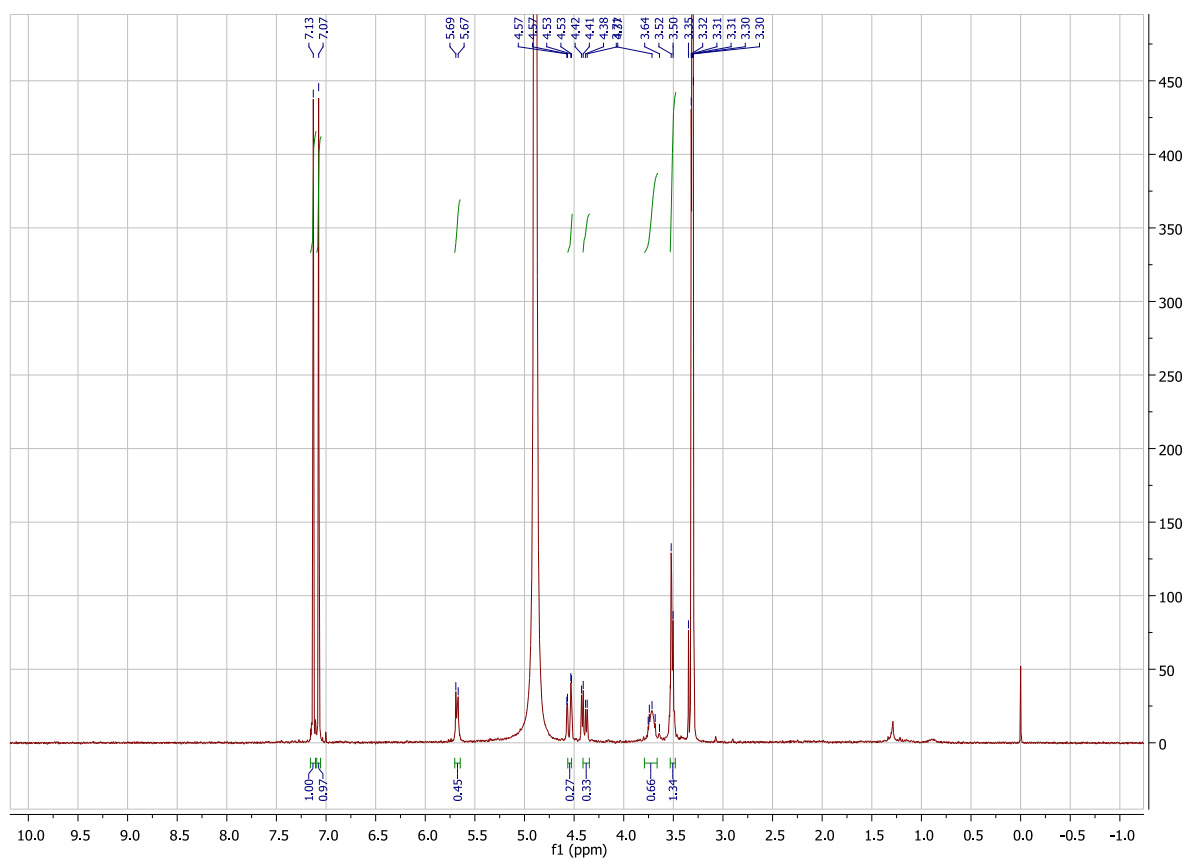
NMR-spekter 11: ^1H NMR-spekter gallesyre (CD_3OD)



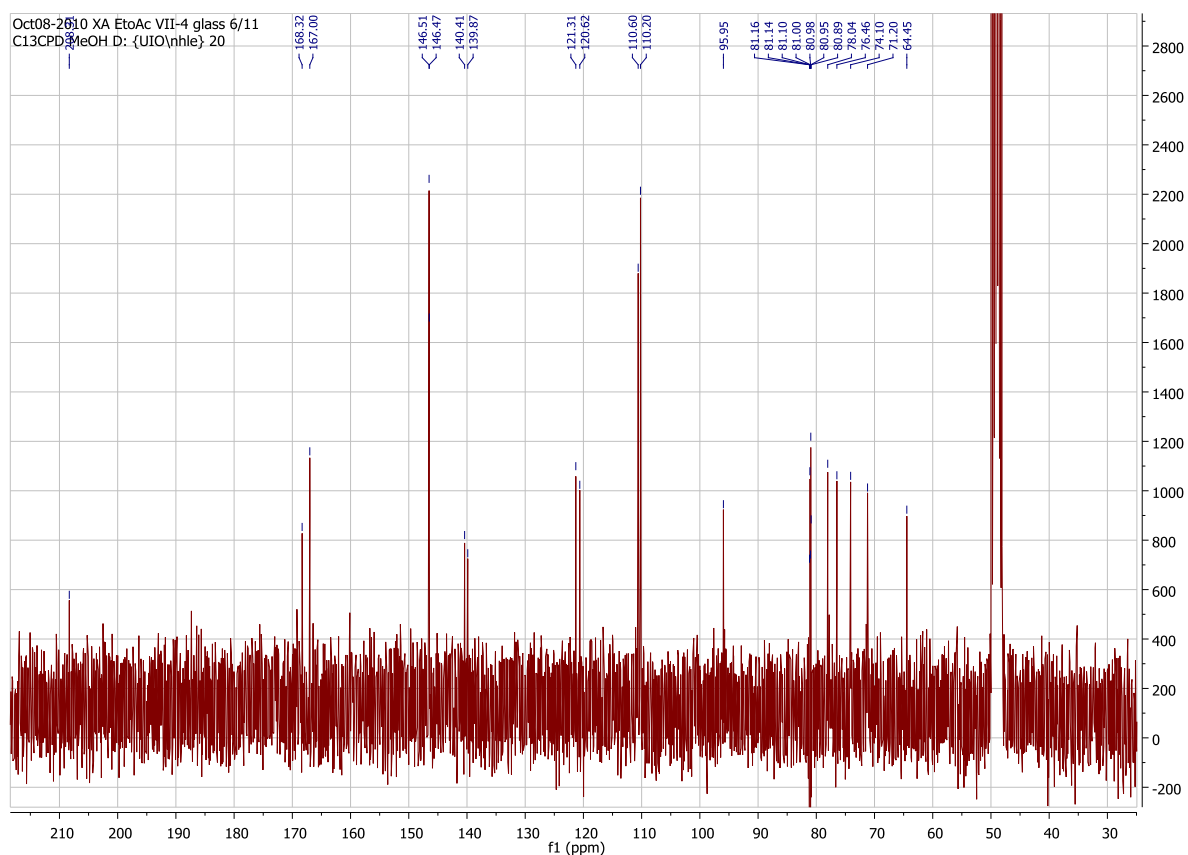
NMR-spekter 12: ^{13}C NMR-spekter gallesyre (CD_3OD)



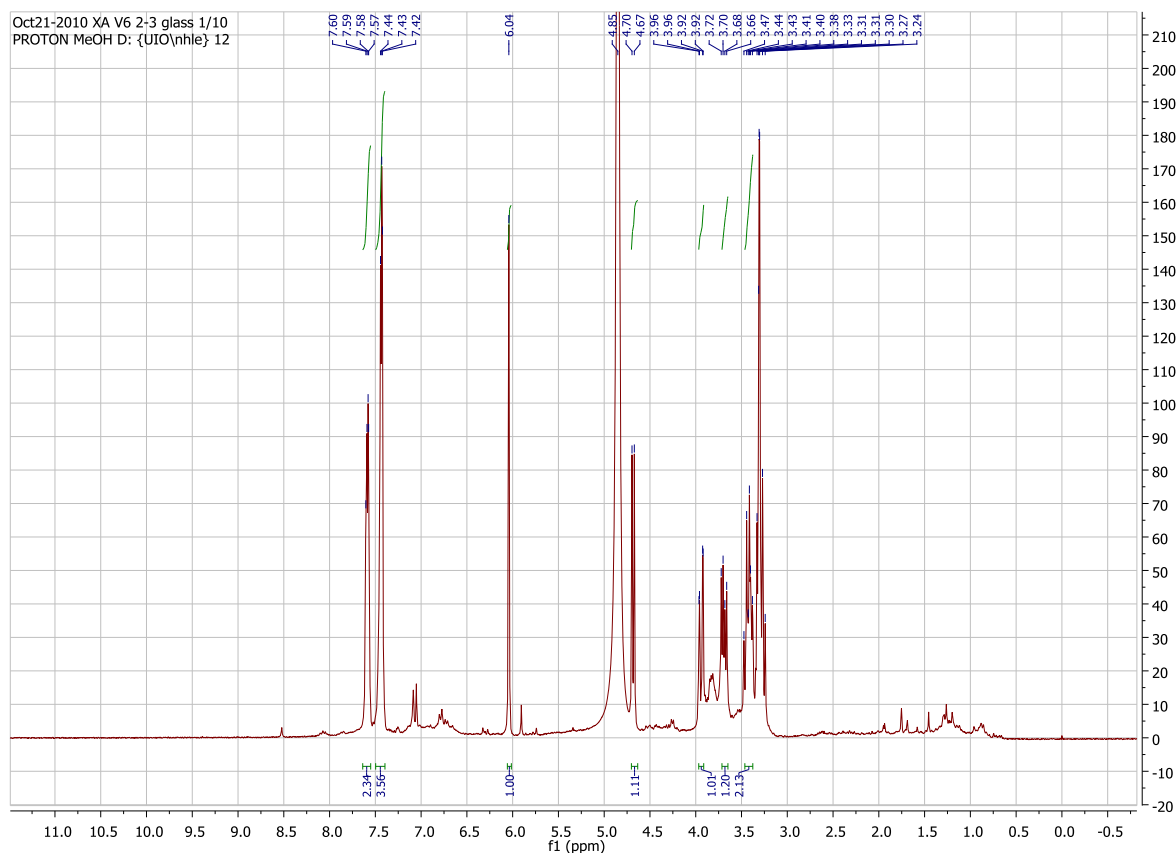
NMR-spekter 13: HMQC-spekter gallesyre (CD_3OD)



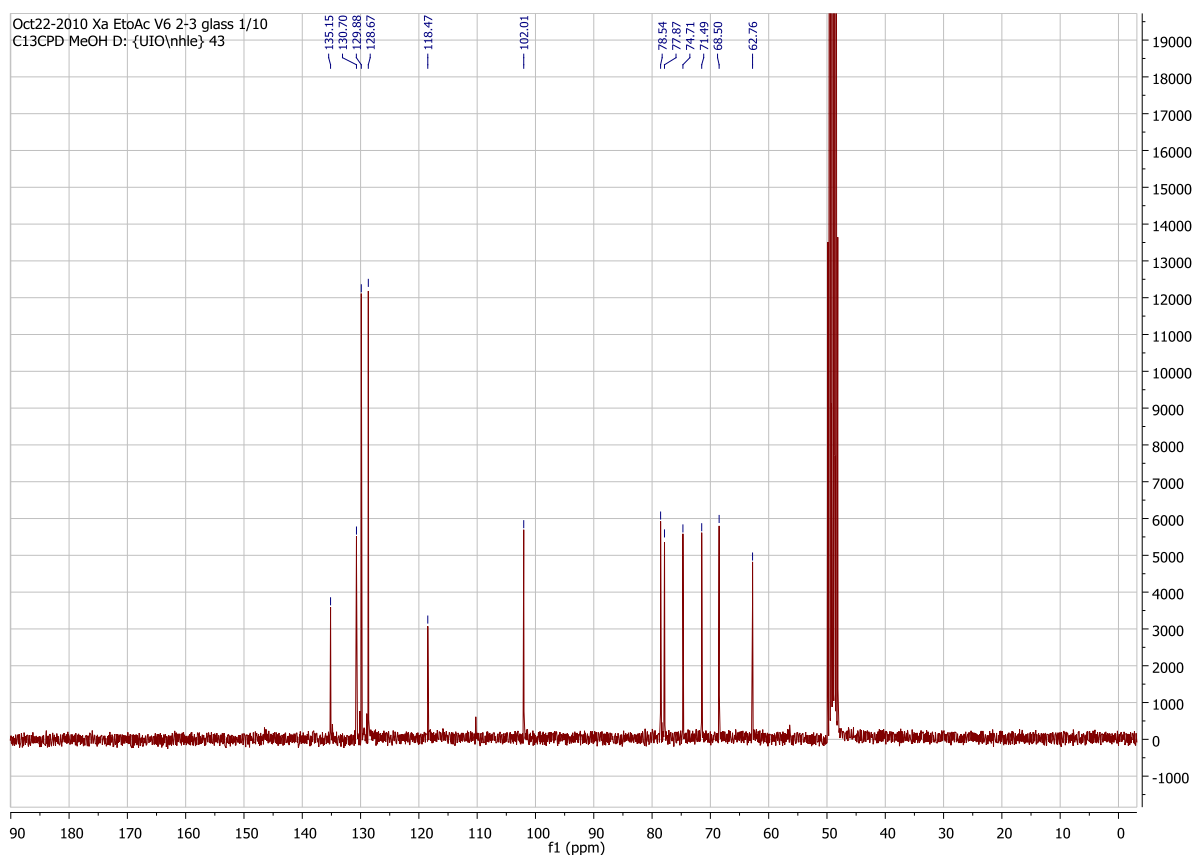
NMR-spekter 14: ^1H NMR-spekter 1.6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose (CD_3OD)



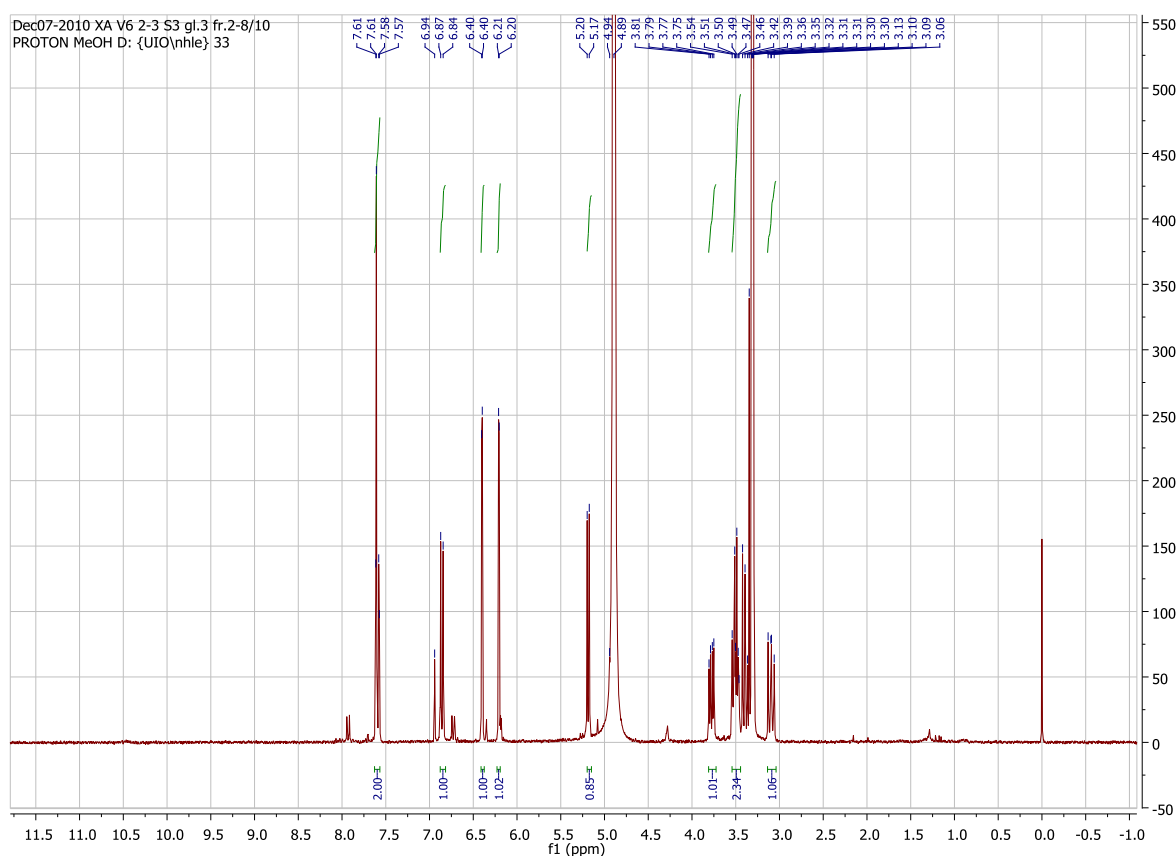
NMR-spekter 15: ^{13}C NMR-spekter 1,6-di-O-galloyl- β -D-glukopyranose (CD_3OD)



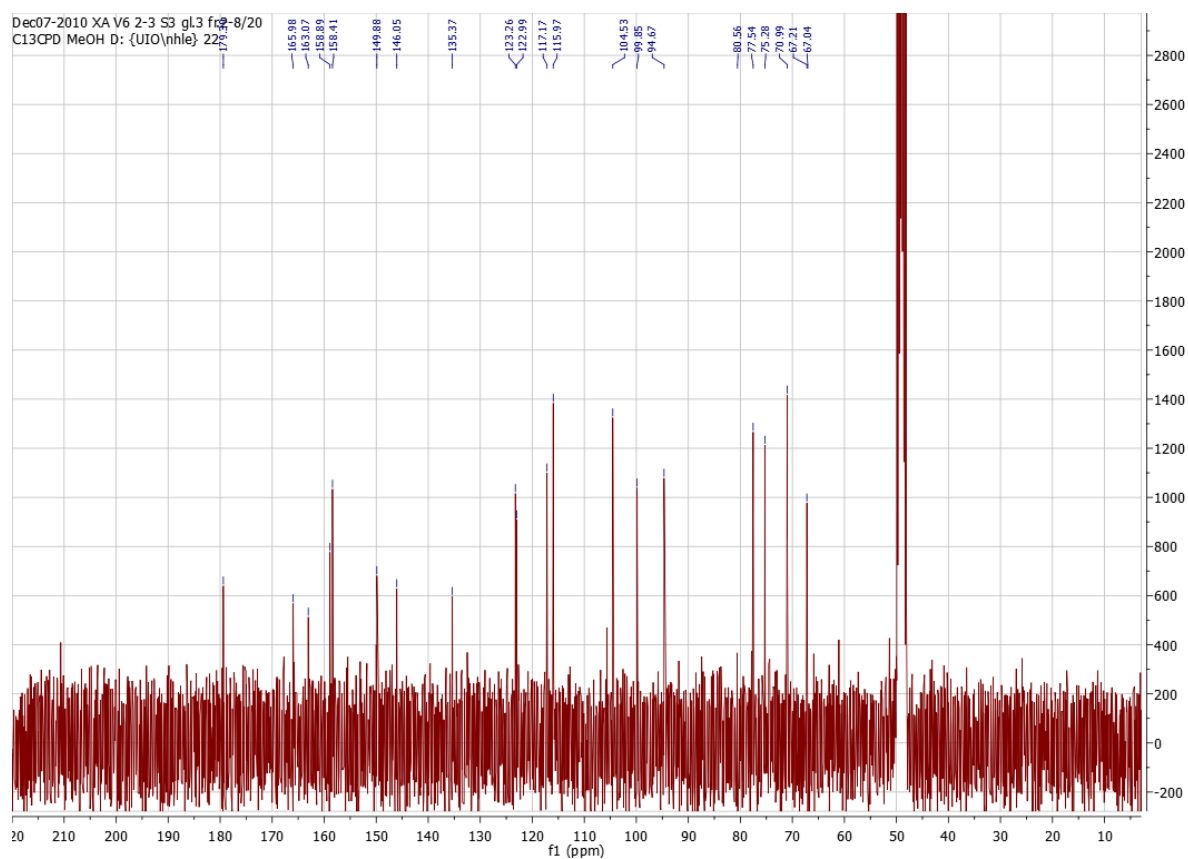
NMR-spekter 16: ^1H NMR-spekter sambunigrin (CD_3OD)



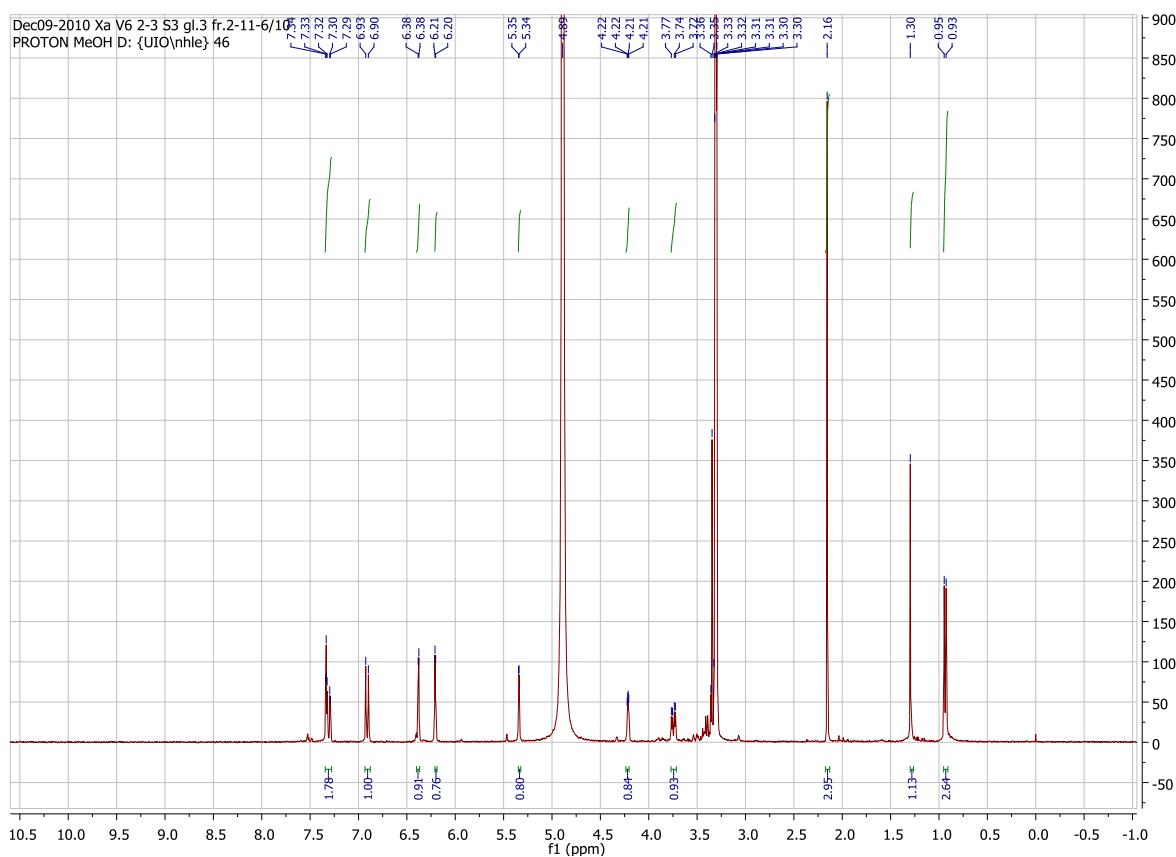
NMR-spekter 17: ^{13}C NMR-spekter sambunigrin (CD_3OD)



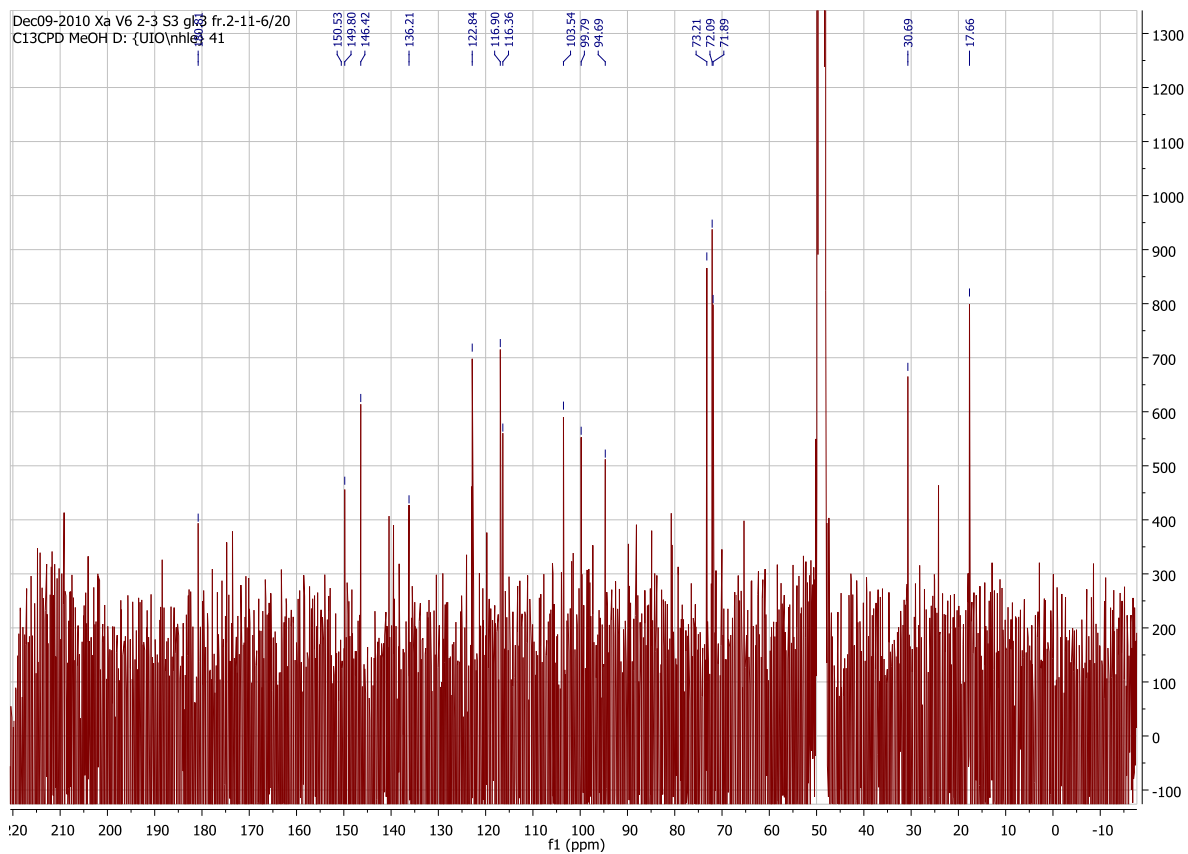
NMR-spekter 18: ^1H NMR-spekter quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid (CD_3OD)



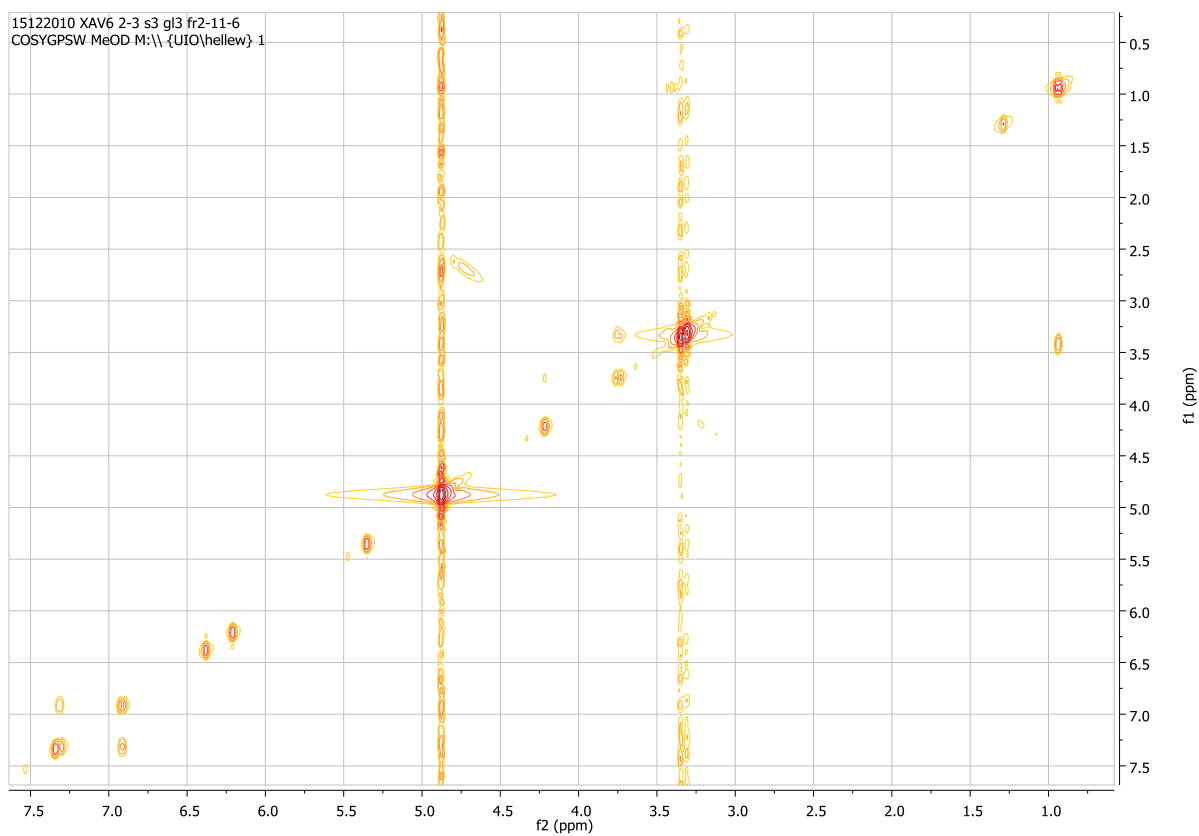
NMR-spekter 19: ^{13}C NMR-spekter quercetin-3-O- β -D-xylopyranosid (CD_3OD)



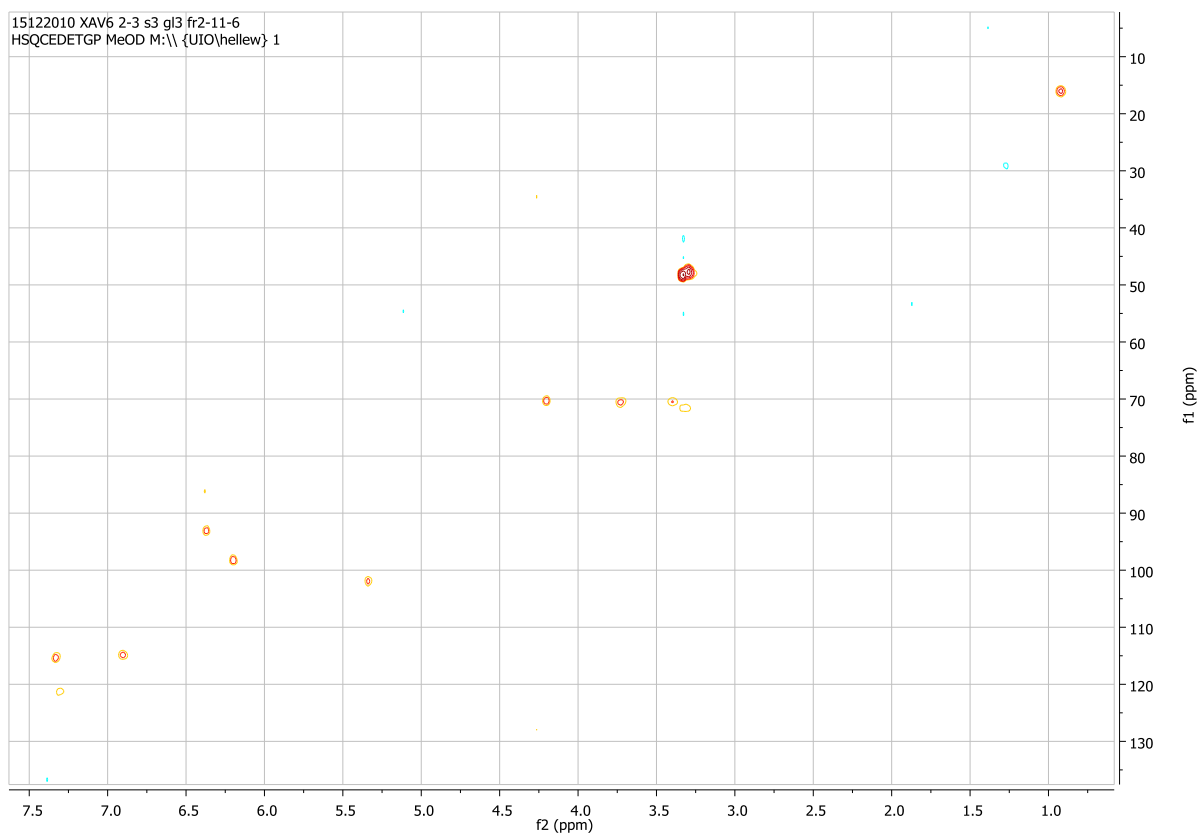
NMR-spekter 20: ^1H NMR-spekter quercetin-3-O-rhamnopyranosid (CD_3OD)



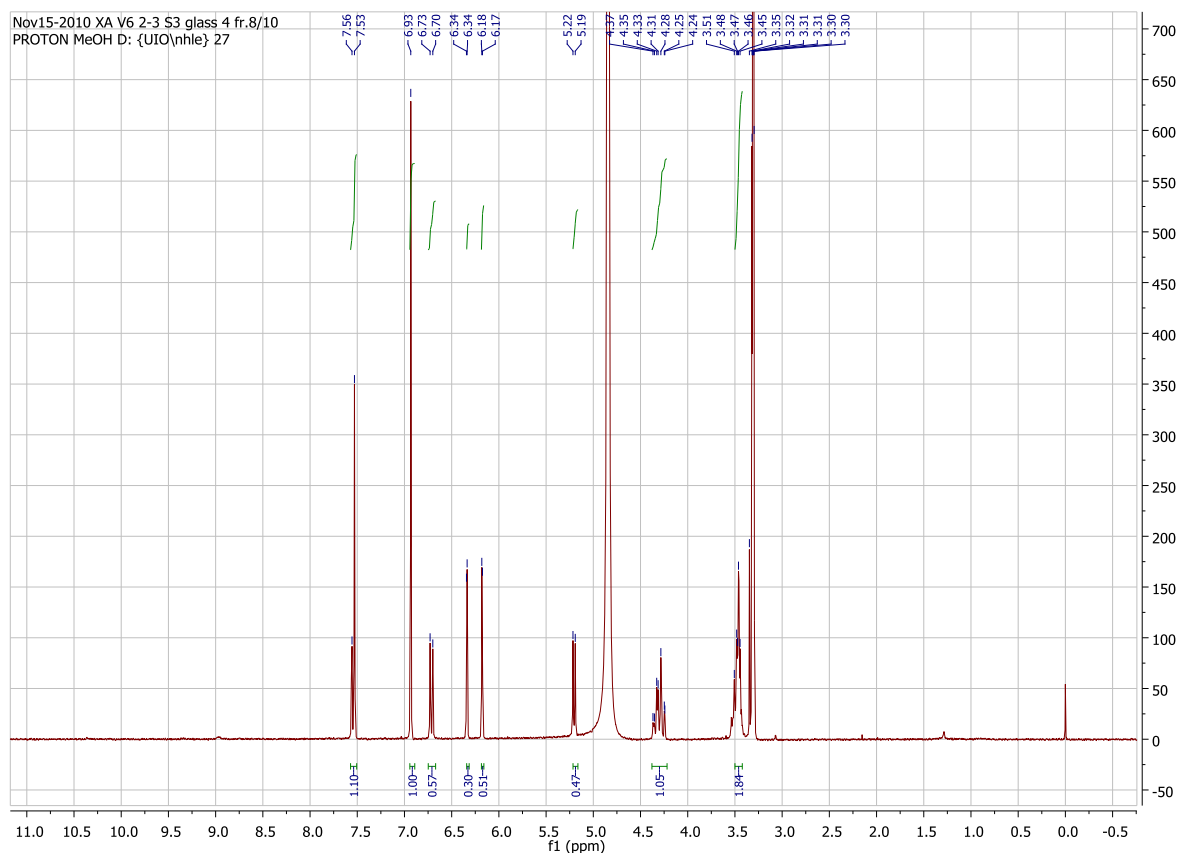
NMR-spekter 21: ^{13}C NMR-spekter quercetin-3-O-rhamnopyranosid (CD_3OD)



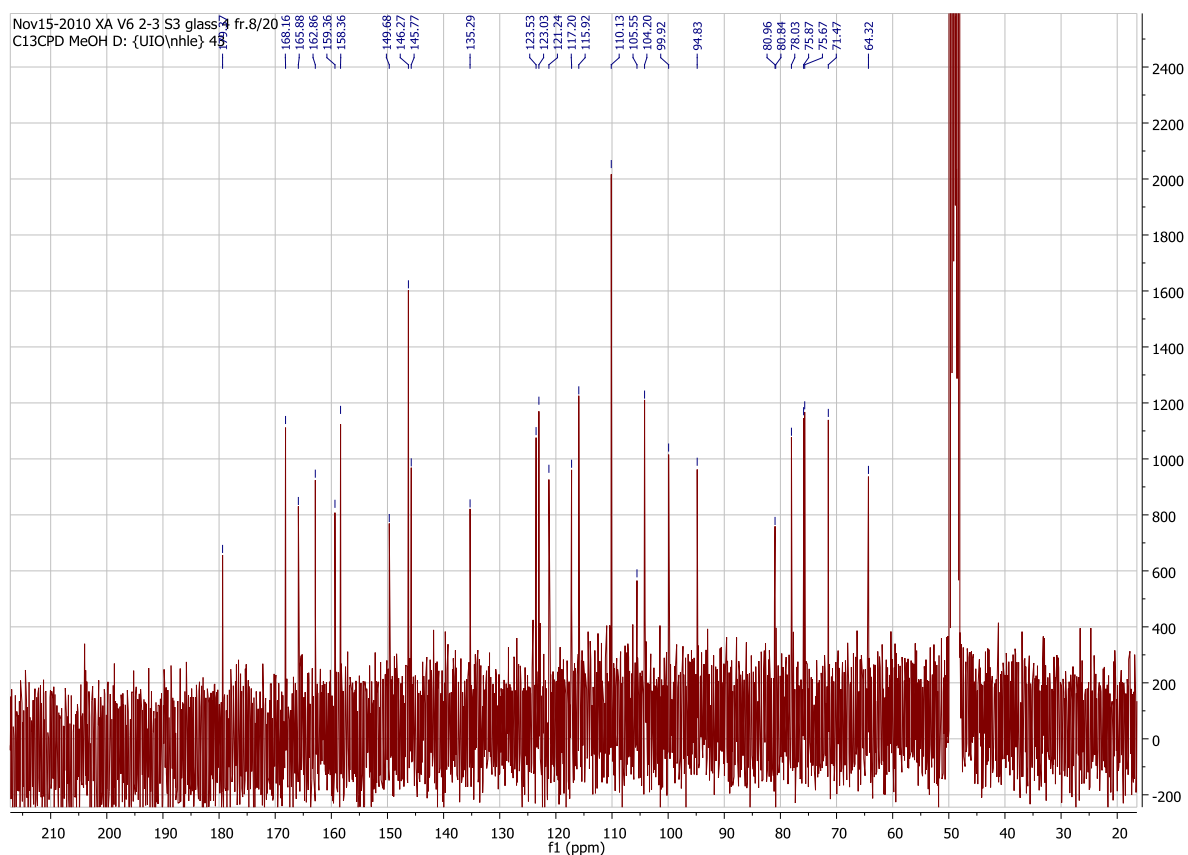
NMR-spekter 22: COSY-spekter quercetin-3-O-rhamnopyranosid (CD_3OD)



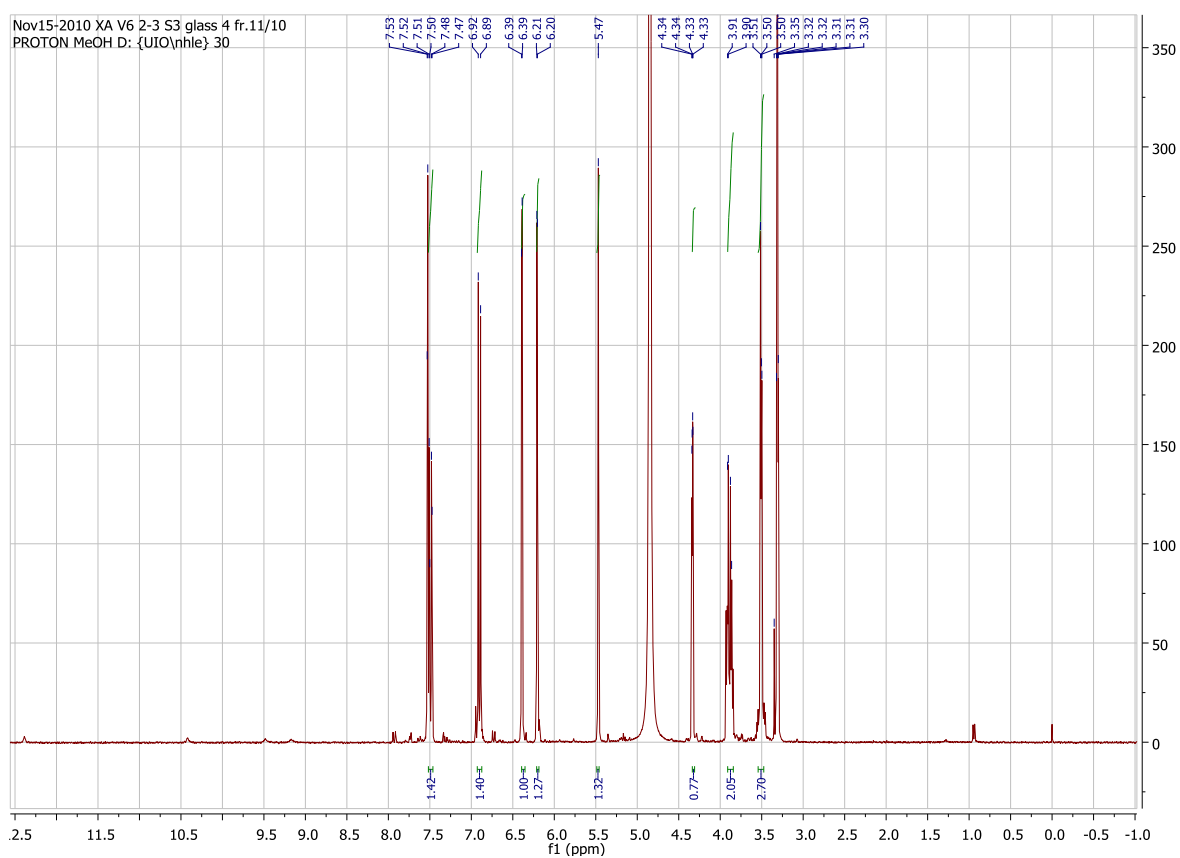
NMR-spekter 23: HSQC-spekter quercetin-3-O-rhamnopyranosid (CD₃OD)



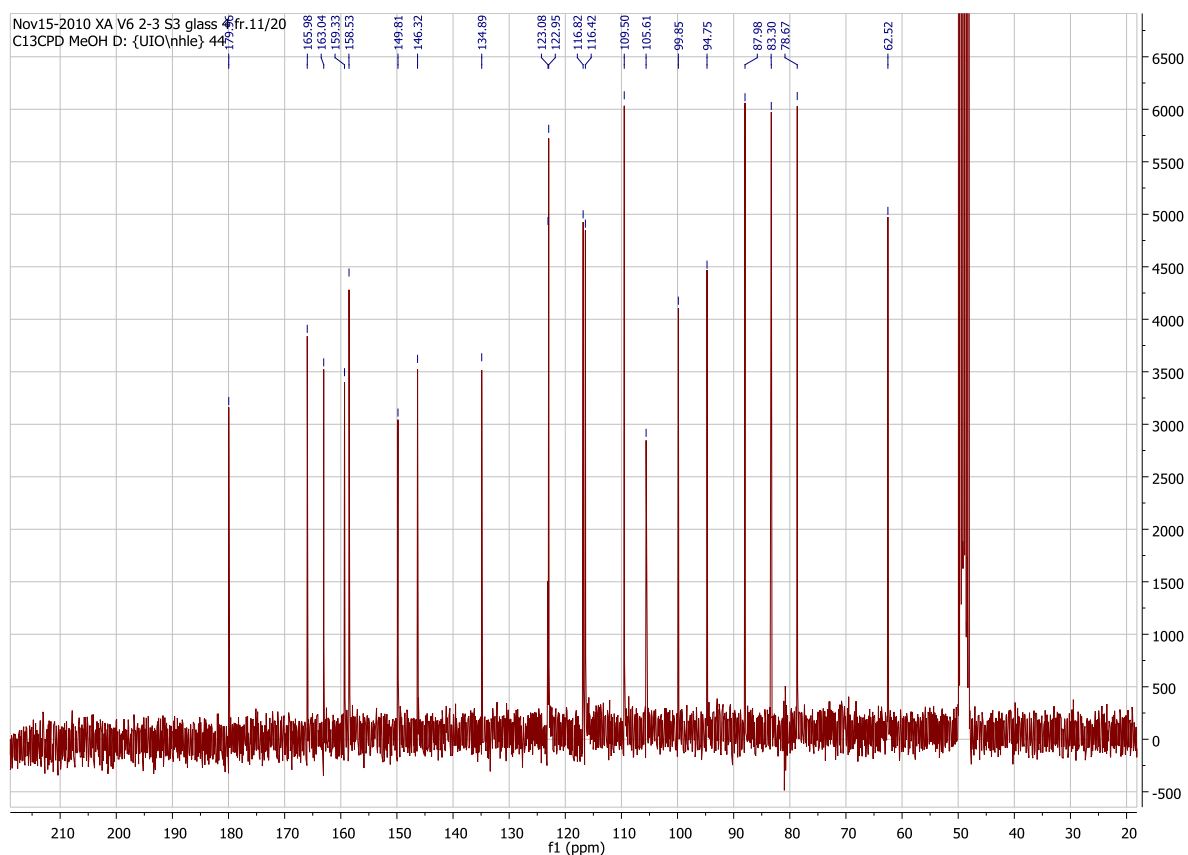
NMR-spekter 24: ¹H NMR-spekter quercetin-3-O-β-D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (CD₃OD)



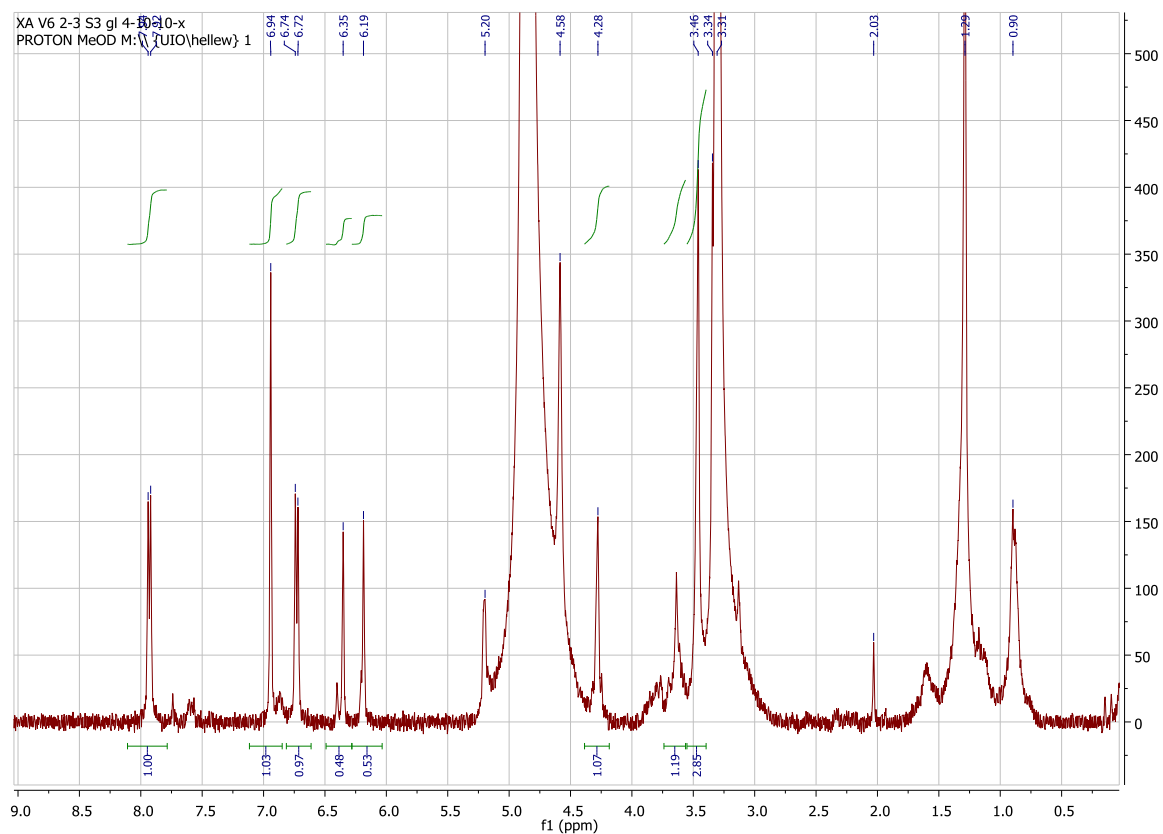
NMR-spekter 25: ^{13}C NMR-spekter quercetin-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (CD_3OD)



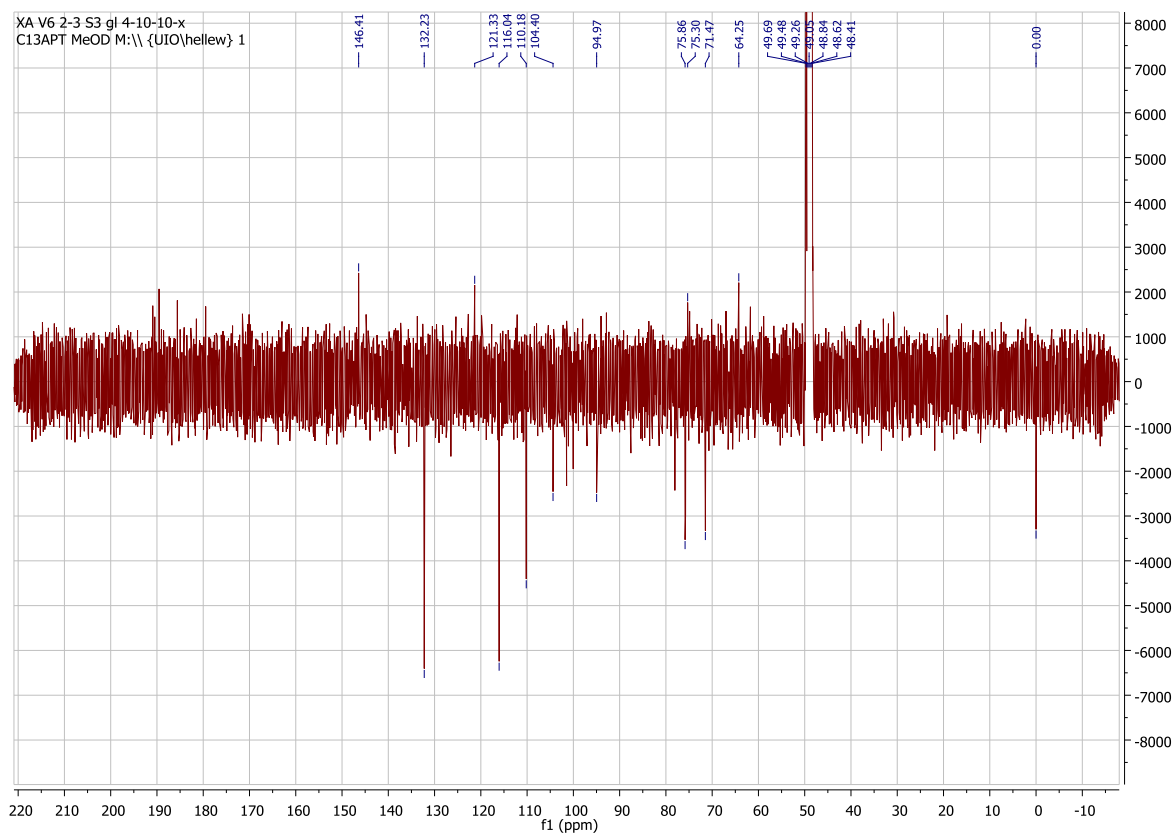
NMR-spekter 26: ^1H NMR-spekter quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (CD_3OD)



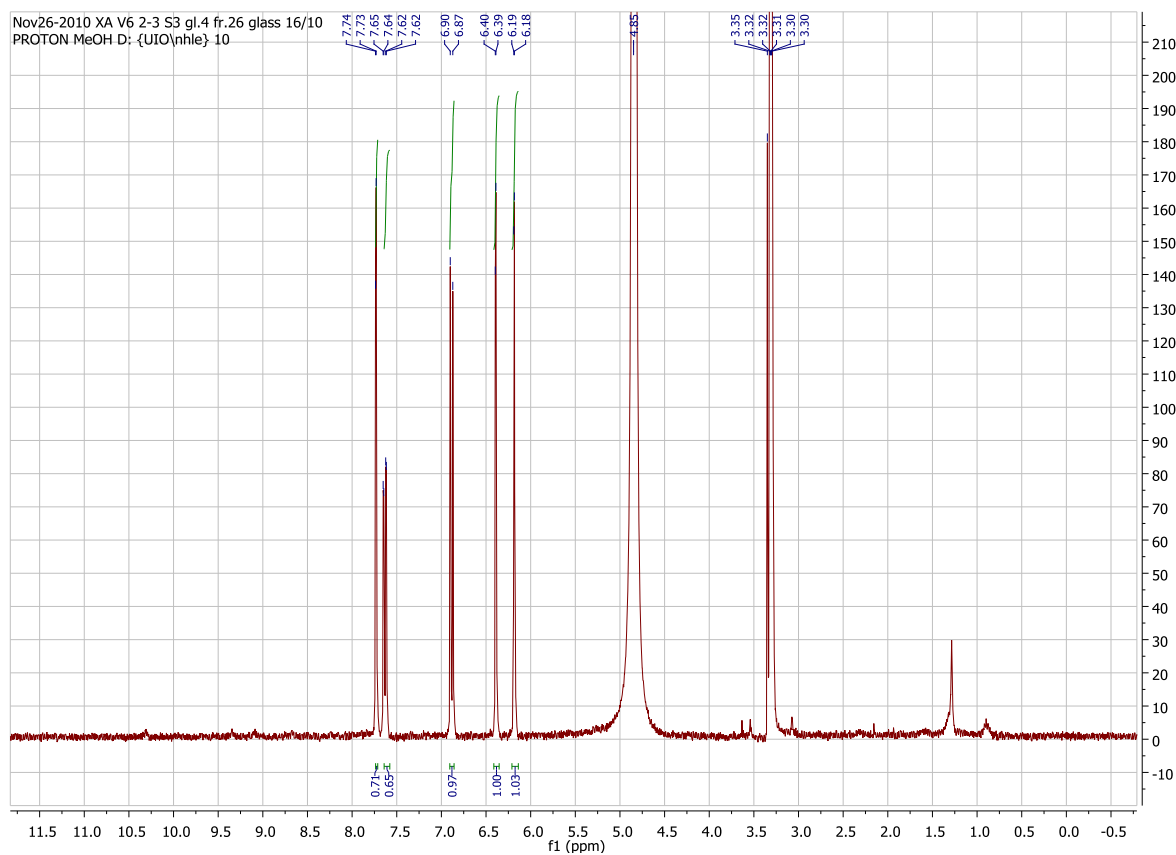
NMR-spekter 27: ^{13}C NMR-spekter quercetin-3-O- α -arabinofuranosid (CD_3OD)



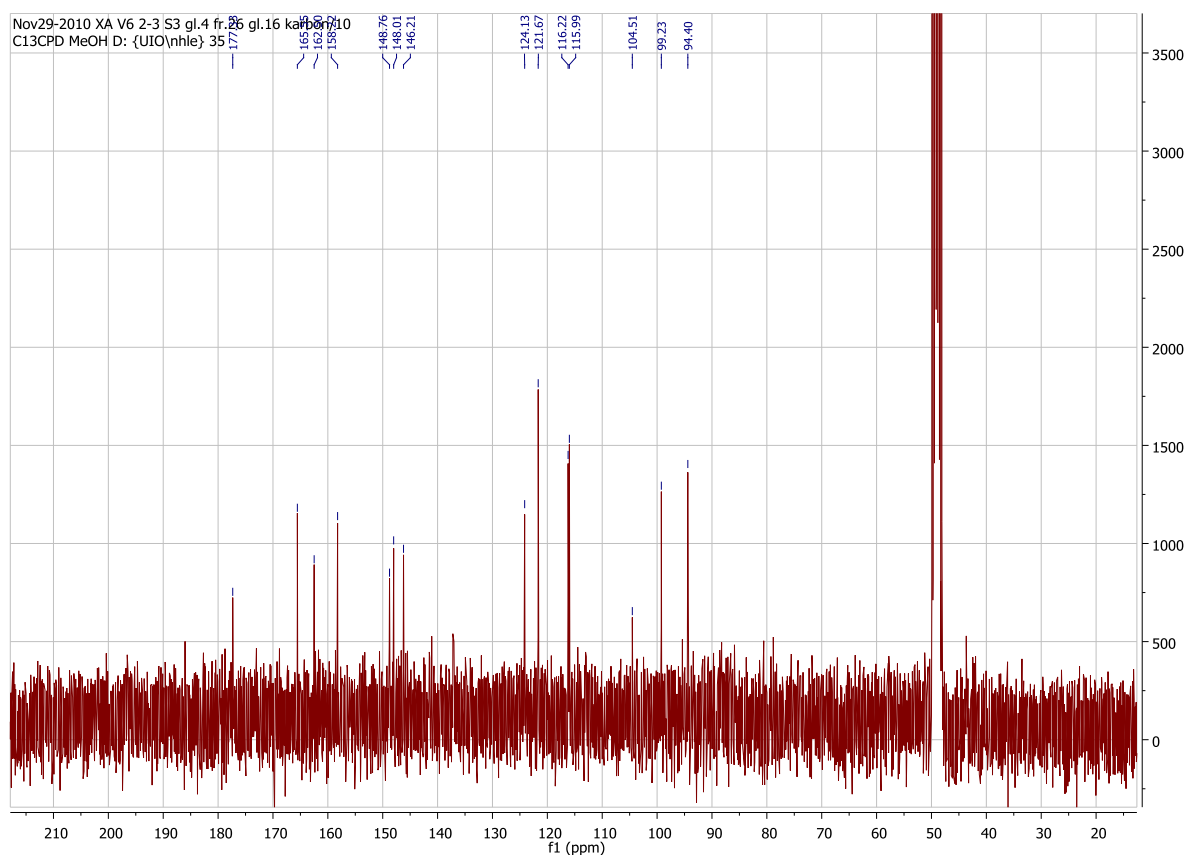
NMR-spekter 28: ^1H NMR-spekter kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (CD_3OD)



NMR-spekter 29: ^{13}C APT NMR-spekter kaempferol-3-O- β -D-(6''-galloyl)-glukopyranosid (CD_3OD)



NMR-spekter 30: ^1H NMR-spekter quercetin (CD_3OD)



NMR-spekter 31: ^{13}C NMR-spekter quercetin (CD_3OD)

10 Kildeliste

- Abah, S.E. og Abah, G. (2010) Antimicrobial and antioxidant potentials of *Agaricus bisporus*. Advances in Biological Research **4**, 277-282.
- Abubakar, A.A. og Salka, M.N. (2010) Neuromuscular behaviour of wistar rats administered methanol extract of *Ximenia americana*. Scholars Research Library **5**, 217-225.
- Africa-Ciel. (2011) Mali. Aksessert 10.mars 2011, fra <http://www.africaciel.com/afrique/portail/index/Mali.html>.
- Agroforestry. (2011) *Ximenia americana*. Aksessert 12.april 2011, fra http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Ximenia_americaana.pdf.
- Arbonnier, M. (2004) Trees, shrubs, and lianas of West African dry zones. Margraf Publishers GMBH, Weikersheim, Tyskland
- Asres, K., Bucar, F., Kartnig, T., Witvrouw, M., Pannecouque, C. og De Clercq, E. (2001) Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. Phytotherapy Research **15**, 62-69.
- Babujanarthanam, R., Kavitha, P. og Pandian, R. (2009) Quercitrin, a bioflavonoid improves homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. Fundamental & Clinical Pharmacology **24**, 357-364.
- Beecher, G. (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. Journal of Nutrition **133**, 3248-3254.
- Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., et al. (1996) *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene **54**, 67-71.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature **181**, 1199-1200.
- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I. og Mendez, J. (2002) Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. Journal of Ethnopharmacology **79**, 379-381.
- Breitmaier, E. (2002). Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide. 3.reviderte utgave, John Wiley & Sons, Hoboken, USA
- Burkill, H.M. (1997). The useful plants of west tropical Africa, families M-R. 2, The Trustees of Royal Botanic Gardens, Surrey, England
- Chen, C.H., Chan, H.C., Chu, Y.T., et al. (2009) Antioxidant activity of some plant extracts towards xanthine oxidase, lipoxygenase and tyrosinase. Molecules **14**, 2947-2958.
- CIA. (2011) Mali. Aksessert 10.mars 2011, fra <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>.
- De-Leo, M., Braca, A., De-Tommasi, N., et al. (2004) Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves: isolation and antimicrobial activity. Planta Medica **70**, 841-846.
- de Araújo, M.R.S., Assunção, J.C.D.C., Dantas, I.N.F., Costa-Lotufo, L.V. og Monte, F.J.Q. (2008) Chemical constituents of *Ximenia americana*. Natural Product Communications **3**, 857-860.
- de Araújo, M.R.S., Monte, F.J.Q. og Braz-Filho, R. (2009) A new sesquiterpene from *Ximenia americana* Linn. Helvetica Chimica Acta **92**, 127-132.
- Dellagrecia, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L. og Simonet, A.M. (2002) Cyanogenic glycosides from *Sambucus nigra*. Natural Product Letters **14**, 175-182.
- Diallo, D. (2010) Ethnopharmacology in Mali. Forelesningsnotater i FRM 5420. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

- Diallo, D. og Paulsen, B.S. (2010) Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: experiences with benefit sharing. Bioprospecting. From biodiversity in the South to medicines in the North. I: Svarstad, H. og Dhillon, S. S. (eds.), Spartacus forlag, Oslo, 133-144.
- Diallo, D., Sogn, C., Samaké, F.B., Paulsen, B.S., Michaelsen, T.E. og Keita, A. (2002) Wound healing plants in Mali, the Bamako region. An ethnobotanical survey and complement fixation of water extracts from selected plants. Pharmaceutical Biology **40**, 117-128.
- Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A., Chakrabarti, S.K. og Nadler, J.L. (2011) Functional and pathological roles of the 12-and 15-lipoxygenases. Progress in Lipid Research **50**, 115-131.
- Edwards, S., Nebel, S. og Heinrich, M. (2005) Questionnaire surveys: Methodological and epistemological problems for field-based ethnopharmacologists. Journal of Ethnopharmacology **100**, 30-36.
- El-Mekki, S., Meselhy, M.R., Kusumoto, I.T., Kadota, S., Hattori, M. og Namba, T. (1995) Inhibitory effects of Egyptian folk medicine on Human Immunodeficiency Virus (HIV) reverse transcriptase. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **43**, 641-648.
- Eromosele, C.O. og Eromosele, I.C. (2002) Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia americana*. Bioresource Technology **82**, 303-304.
- Finnermore, H. og Cooper, J.M. (1938) The cyanogenetic constituents of Austrian and other plants. Journal of the Society of Chemical Industry **57**, 162-169.
- Funk, C.D. og Cyrus, T. (2001) 12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis. Trends in Cardiovascular Medicine **11**, 116-124.
- Geyid, A., Abebe, D., Debella, A., et al. (2005) Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. Journal of Ethnopharmacology **97**, 421-427.
- Gilani, A.H. og Rahman, A. (2005) Trends in ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology **100**, 43-49.
- Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K.E. (2005). Kromatografi: separasjon og deteksjon. Universitetsforlaget, Oslo
- Grønhaug, T.E., Glaeserud, S., Skogsrud, M., et al. (2008) Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **4**, 1-11.
- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? Drugs **42**, 569-605.
- Halliwell, B. (2005) Free radicals and other reactive species in disease. Aksessert 28.mars 2011, fra <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/pdf>.
- Halliwell, B. og Gutteridge, J.M.C. (2007). Free radicals in biology and medicine. 4.utgave, Oxford University Press Inc., New York, USA
- Hansen, T.V. (2010) NMR-spektroskopi. Forelesningsnotater i FRM 4030. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
- Hasan, M.M., Ahmed, S.W., Azhar, I. og Bano, H. (2010) Phytoconstituents isolated from *Phoenix sylvestris* Roxb. Journal of Basic and Applied Sciences **6**, 17-22.
- Hatt, H.H., Triffett, A.C.K. og Wailes, P.C. (1960) Acetylenic acids from fats of the olacaceae and santalaceae. Australian Journal of Chemistry **13**, 488-497.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. og Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry **13**, 572-584.

- Heinrich, M. (2003) Ethnobotany and natural products. The search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?. Current Topics in Medicinal Chemistry **3**, 141-154.
- Heinrich, M. og Gibbons, S. (2001) Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. Journal of Pharmacy and Pharmacology **53**, 425-432.
- Hemamalini, K., Srikanth, A., Sunny, G. og Praneethkumar, H. (2011) Phytochemical screening and analgesic activity of methanolic extract of *Ximenia americana*. Current Pharma Research **2**, 153-156.
- Henke, H. (1995). Preparative gel chromatography on sephadex LH-20. Hüthig verlag Heidelberg, Heidelberg, Tyskland
- ITIS. (2011) ITIS report, *Ximenia americana*. Aksessert 6.november 2010, fra http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27850.
- Kadota, S., Takamori, Y., Nyein, K.N., Kikuchi, T., Tanaka, K. og Ekimoto, H. (1990) Constituents of the leaves of *Woodfordia fruticosa* KURZ. I. Isolation, structure, and proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance signal assignments of Woodfruticosin (Woodfordin C), an inhibitor of deoxyribonucleic acid topoisomerase II. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **38**, 2687-2697.
- Kim, M.Y., Kim, Y.C. og Chung, S.K. (2005) Identification and *in vitro* biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. Journal of the Science of Food and Agriculture **85**, 633-640.
- Koné, W.M., Atindehou, K.K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traore, D. og Dosso, M. (2004) Traditional medicine in north Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology **93**, 43-49.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., et al. (2009) Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Journal of Ethnopharmacology **123**, 369-377.
- Kumaraswamy, M.V., Raghavendra, M.P. og Satish, S. (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activity of isolated phytoconstituent from *Woodfordia fruticosa*. Journal of Pharmacy Research **3**, 1492-1495.
- Lambert, J.B. og Mazzola, E.P. (2004). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Pearson Education Inc., New Jersey, USA
- Lamien-Meda, A., Lamien, C.E., Compaore, M.M.Y., et al. (2008) Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules **13**, 581-594.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S.D., Giamberardino, M.A. og Cuccurullo, F. (2003) Dihydrolipoic acid inhibits 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. Free Radical Biology and Medicine **35**, 1203-1209.
- Lyckander, I.M. og Malterud, K.E. (1990) Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Orthosiphon spicatus*. I: Das, N. (red.): Flavonoids in biology and medicine III: Current issues in flavonoid research **5**, 469-474.
- Lyckander, I.M. og Malterud, K.E. (1996) Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids **54**, 239-246.
- Magassouba, F.B., Diallo, A., Kouyate, M., et al. (2007) Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology **114**, 44-53.
- Maikai, V.A. (2011) Antitrypanosomal activity of flavonoid extracted from *Ximenia americana* stem bark. International Journal of Biology **3**, 115-121.

- Maikai, V.A., Kobo, P.I. og Adaudi, A.O. (2008) Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana*. African Journal of Biotechnology **7**, 1600-1603.
- Maikai, V.A., Kobo, P.I. og Maikai, B.V.O. (2010) Antioxidant properties of *Ximenia americana*. African Journal of Biotechnology **9**, 7744-7746.
- Malterud, K.E. (2009) Procedure for DPPH assay for radical scavenging. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
- Malterud, K.E., Farbrot, T.L., Huse, A.E. og Sund, R.B. (1993) Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. Pharmacology **47**, 77-85.
- Malterud, K.E. og Rydland, K.M. (2000) Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**, 5576-5580.
- Masuda, T., Iritani, K., Yonemori, S., Oyama, Y. og Takeda, Y. (2001) Isolation and antioxidant activity of galloyl flavonol glycosides from the seashore plant, *Pemphis acidula*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **65**, 1302-1309.
- Mevy, J.P., Bessiere, J.M., Greff, S., Zombre, G. og Viano, J. (2006) Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. Biochemical Systematics and Ecology **34**, 549-553.
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T. og Hrdina, R. (2010) Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine **49**, 963-975.
- Molyneux, P. (2004) The use of a stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal of Science and Technology **26**, 211-219.
- NORAD. (2011) Norsk bistand i tall. Aksessert 10.mars 2011, fra <http://www.norad.no/Norskbistandital/Statistikkvisning?view=historical&rid=62&fyr=1999&tyr=2009>.
- Ogunleye, D.S. og Ibitoye, S.F. (2003) Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research **2**, 239-241.
- Omastová, M., Mosnáckova, K., Trchová, M., et al. (2010) Polypyrrole and polyaniline prepared with cerium(IV)sulfate oxidant. Synthetic Metals **160**, 701-707.
- Omer, M.E.F.A. og Elnima, E.I. (2003) Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. Fitoterapia **74**, 122-126.
- Owen, R.W., Haubner, R., Hull, W.E., et al. (2003) Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food and Chemical Toxicology **41**, 1727-1738.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A. og Szabó, C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. Pharmacology Reviews **58**, 87-114.
- Pawlowska, A.M., De-Leo, M. og Braca, A. (2006) Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**, 10234-10238.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E. (2004). Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen
- Pistelli, L., Cammilleri, A., Manunta, A., Marsili, A. og Morelli, I. (1993) Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *Cernuum*. Phytochemistry **33**, 1537-1539.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. og Flower, R.J. (2007). Pharmacology. 6. utgave, Churchill Livingstone, Edinburgh, Skottland
- Saeed, A.E.M. og Bashier, R.S.M. (2010) Physico-chemical analysis of *Ximenia americana* L. seed oil and structure elucidation of some chemical constituents of its seed oil and fruit pulp. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy **2**, 49-55.

- Solomons, T.W.G. og Fryhle, C.B. (2004). Organic chemistry. 8.utgave, John Wiley & Sons, Hoboken, USA
- Soro, T.Y., Traoré, F., Datte, J.Y. og Nene-Bi, A.S. (2009) Antipyretic activity of aqueous extract from *Ximenia americana*. Phytoterapie **7**, 297-303.
- Sroka, Z. og Cisowski, W. (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. Food and Chemical Toxicology **41**, 753-758.
- Togola, A., Austarheim, I., Theïs, A., Diallo, D. og Paulsen, B.S. (2008) Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: a comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **4**, 1-9.
- UIO. (2011) The Malian medicinal plant project. Improved traditional medicines. Aksessert 12.mars 2011, fra <http://www.farmasi.uio.no/maliplants/ITM.html>.
- USDA. (2011) Classification for Kingdom Plantae down to species *Ximenia americana* L. Aksessert 15.mars 2010, fra <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=XIAM&display=63>.
- Voss, C., Eyol, E., Frank, M., von der Lieth, C.W. og Berger, M.R. (2006) Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia americana*. The FASEB Journal **20**, 334-345.
- Wikipedia. (2011) Mali. Aksessert 10.mars 2011, fra <http://no.wikipedia.org/wiki/Mali>.
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.I. og Nishioka, I. (1998) Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Biochemical Pharmacology **56**, 213-222.
- Zhang, Y., Dewitt, D.L., Murugesan, S. og Nair, M.G. (2004) Novel lipid-peroxidation-and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrochiza kurroa* seeds. Chemistry & Biodiversity **1**, 426-441.